

FLUORESZCENS SZENZOR- ÉS JELZŐMOLEKULÁK SZINTÉZISE ÉS VIZSGÁLATA

Doktori Értekezés

Nagy Krisztina

okleveles vegyész

Témavezető:

Dr. Kele Péter, egyetemi adjunktus

Dr. Kotschy András, habilitált egyetemi docens

KÉMIA DOKTORI ISKOLA

Vezető: Dr. Inzelt György

**SZINTETIKUS KÉMIA, ANYAGTUDOMÁNY,
BIOMOLEKULÁRIS KÉMIA PROGRAM**

Programvezető: Dr. Perczel András



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Kémiai Intézet

Budapest, 2011.

Tartalom

1.	RÖVIDÍTÉSEK ÉS TRIVIÁLIS NEVEK JEGYZÉKE	3
2.	BEVEZETÉS	4
3.	FLUORESZCENS SZENZOROK	4
3.1.	BELSŐ TÖLTÉSÁTVITELI (ICT) SZENZOROK	5
3.2.	FOTOINDUKÁLT ELEKTRONTRANSZFER (PET) SZENZOROK	8
3.3.	EXCIMER SZENZOROK	10
3.4.	CÉLKITŰZÉSEK	12
3.5.	SAJÁT EREDMÉNYEK – FLUORESZCENS SZENZOROK (ELŐZMÉNYEK)	13
3.5.1.	Fluoreszcens szenzorok szintézise – A konformáció szerepének vizsgálata	17
3.5.2.	NMR-titrálások	20
3.5.3.	Fluoreszcens mérések	22
3.5.3.	ÖSSZEFOGLALÁS	28
4.	FLUORESZCENS JELZŐMOLEKULÁK ÉS JELENTŐSÉGÜK	29
4.1.	A BIOORTOGONÁLIS JELÖLÉS LEHETŐSÉGEI	30
4.1.1.	Alkinok és azidok közti 1,3-dipoláris cikloaddíció	31
4.1.2.	Alkének és tetrazolok fotoindukált cikloaddíciója	33
4.1.3.	Staudinger-ligáció	33
4.1.4.	Fordított elektronigényű Diels-Alder reakció	34
4.2.	CÉLKITŰZÉSEK	35
4.3.	SAJÁT EREDMÉNYEK – FLUORESZCENS JELZŐMOLEKULÁK (ELŐZMÉNYEK)	36
4.3.1.	A „klikk”-reakcióba vihető NIR festékek előállítása	38
4.3.2.	A festékek fluoreszcens tulajdonságai	41
4.3.3.	A festékek alkalmazhatósága	43
4.4.	ÖSSZEFOGLALÁS	46
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	47
6.	SUMMARY	48
7.	KÍSÉRLETI RÉSZ	49
7.1.	REPRODUKCIÓS KÍSÉRLETEK	51
7.2.	ÚJ VEGYÜLETEK SZINTÉZISE	55
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	63
8.	IRODALOMJEGYZÉK	64

1. Rövidítések és triviális nevek jegyzéke

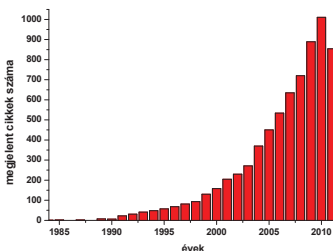
Bn	benzil
Bu	butil
CuAAC	réz(I)-katalizált 1,3-dipoláris cikloaddíció (Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition)
CHO	kínai hörsög petefészek (Chinese Hamster Ovary)
DCM	diklórmétán
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
EET	energiatranszfer (Energie Transfer)
GC	gázkromatográfia
FE	fluoreszcencia-erősítés
HRMS	nagyfelbontású tömegspektroszkópia (High Resolution Mass Spectrometry)
ICT	belső töltésátvitel (Internal Charge Transfer)
Me	metil
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MS	tömegspektroszkópia (Mass Spectrometry)
NIR(S)	közeli infra vörös spektroszkópia (Near Infrared Spectroscopy)
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance)
PBS	foszfát puffer (Phosphate Buffered Saline)
PET	fotoindukált elektrontranszfer (Photoinduced Electron Transfer)
Ph	fenil
<i>p</i> TsOH	<i>p</i> -toluolszulfonsav
<i>t</i> Bu	tercierbutil
TBTA	tris(benziltriazolilmetil)-amin
TEA	triethylamin
THF	tetrahidrofurán
Ts	<i>p</i> -toluol-szulfonil (tozil)

2. Bevezetés

A doktori értekezés két független tudományterületen végzett kutatásaimat foglalja össze, amelyeket egy közös jelenség, a fluoreszcencia köt össze. Munkám első részében a fluoreszcens szenzorok, ezen belül az ún. fotoindukált elektrontranszfer (PET) szenzorok működési mechanizmusának vizsgálatával foglalkoztam. Ez irányú kutatásaink mozgatórugója az a tény volt, hogy a szenzorcsaládra jellemző, a szakirodalomban jól leírt működési mechanizmus ellenére anomáliákat tapasztaltunk a jelátviteli folyamat során. Ezen megfigyelésektől inspirálva vizsgáltuk meg annak lehetőségét, hogy milyen más mechanizmus tehető felelőssé az információnak a receptorról a jelkibocsátó egységre való áramlásáért. Munkám második részében biológiai jelölésre alkalmas, ún. bioortogonális jelzővegyületek szintézisét valósítottam meg. A téma terület népszerűségének ellenére eddig kevés hatékony, az elvárásoknak megfelelő fotofizikai tulajdonságú festékmolekulát állítottak elő. Jelen disszertáció alapjául négy cikk szolgál, melyek közül kettő kapcsolódik szorosabban az általam elvégzett munkához. Az irodalmi áttekintés során törekedtem a szenzorok, illetve bioortogonális jelzővegyületek minél szélesebb körű bemutatására, figyelembe véve a dolgozat terjedelmével kapcsolatos korlátokat.

3. Fluoreszcens szenzorok

Napjaink növekvő jelentőségű kutatási területe a fluoreszcens szenzorvegyületek fejlesztése és alkalmazása. Ez a tendencia jól megfigyelhető a téma területén megjelent cikkek számának évenkénti bontásában (1. ábra).



1. ábra. Fluoreszcens szenzorok a molekuláris felismerésben (a megjelent publikációk száma évenkénti bontásban, 2011.09.20-ai adat)

A fluoreszcens szenzorok népszerűségének oka számos előnyös tulajdonságukban rejlik.^{1,2,3} Ezek közül a legfontosabb, hogy a jelkibocsátó, fluoreszcens modulnak köszönhetően igen nagy érzékenyséű detektálást tesznek lehetővé. Ez a nagyfokú érzékenység egyes technikák esetében akár egyetlen molekula kimutatását is lehetővé teszi.^{4,5} További kedvező tulajdonság az ún. ki-bekapcsolhatóság, a könnyű és viszonylag olcsó detektálhatóság, és a jó tér- és időbeli felbontóképesség, amelyek mind lehetőséget nyújtanak az ember és molekula közti kommunikáció megvalósítására. A szenzorok alkalmazhatósági körét szélesíti, hogy mind oldat fázisban, mind felszínhez kötött formában – például optikai szálon immobilizálva – felhasználhatóak.⁶ Fontos megemlíteni azt a tényt is, hogy a szerkezetbeli tulajdonságok fluoreszcencia-intenzitásra gyakorolt hatását jól megalapozott tudományos háttér írja le.⁷ A szenzorok tervezése során olyan molekuláris változások, mint a kettős kötés torziója, alacsony energiájú $n-\pi^*$ elektronátmenet, átmenetifémek komplexálása, másodlagos kötések kialakulása vagy megszűnése a molekulán belül, belső töltésátvitel (ICT), elektronátmenet (PET) és energiaátmenet (EET) lehetősége mind felhasználható a molekuláris felismerésben, illetve figyelembe kell vennünk a kiterjedt delokalizáció és a solvatació hatását is.

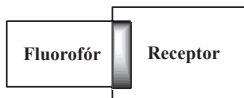
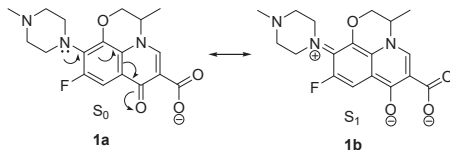
A szenzormolekulák moduláris felépítésére jellemző, hogy elkülöníthető bennük az adott célvegyületre (*vendégmolekula-guest*) specifikus receptorrés (*jelfelismerő-host*), illetve egy fluorofór csoport (*jelkibocsátó*).⁷ A felismerést követően a jelátalakítási folyamat során a fluorofór spektrális tulajdonságai megváltoznak. Ezen változások követése teszi lehetővé az adott vendégmolekula komplexálásának detektálását.

Fluoreszcens szenzorokkal leggyakrabban fémkationokat^{8,9,10} és összetett anionokat^{11,12} határoznak meg. Szerves vegyületek kimutatására kevésbé elterjedt ez a módszer, ennek ellenére ilyen jellegű felhasználás is található a szakirodalomban, erre példa a saxitoxin^{13,14} és származékainak meghatározása. A következő fejezetben a leggyakrabban alkalmazott szenzortípusok (ICT, PET, excimer) kerülnek bemutatásra.

3.1. Belső töltésátviteli (ICT) szenzorok

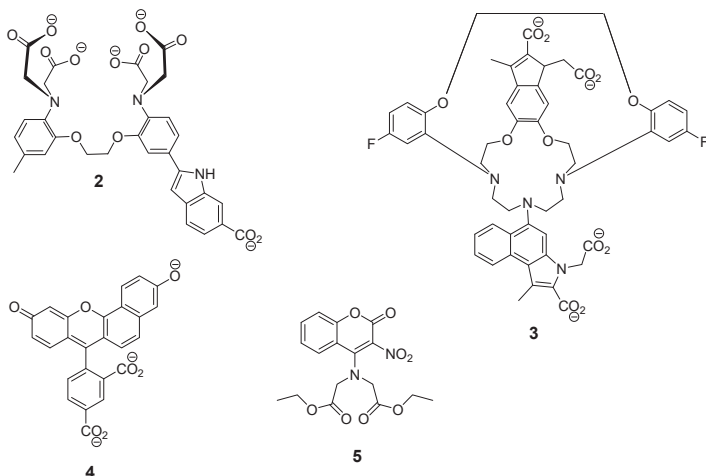
A belső töltésátviteli szenzorcsalád minden tagjára jellemző a gerjesztett állapotban fellépő töltéstranszfer. A családon belül megkülönböztetünk: (a) belső töltésátviteli (*internal charge transfer* - ICT), (b) fémről a ligandumra áthelyeződő töltésen alapuló (*metal to ligand charge transfer* - MLCT), (c) „csavart szerkezetű” belső töltésátviteli (*twisted internal charge transfer* - TICT) és (d) kötésen át érvényesülő töltésátvitelen alapuló (*through-bond charge*

transfer) szenzorokat. Ebben a fejezetben az (a) típusba tartozó ICT szenzorokat mutatom be részletesebben. Heteroatomot tartalmazó π -elektron rendszerek legalacsonyabb energiájú gerjesztett állapotának (S_1 - pl. **1b**)¹⁵ és alapállapotának (S_0 – pl. **1a**) töltéssűrűség különbsége relatív nagy érték.¹⁶ A gerjesztett állapotban megfigyelhető megnövekedett dipolusmomentum következtében ezen szenzorok fluoreszcens modulja igen érzékeny az oldószer polaritására. Ez az érzékenység a szenzor fluoreszcens hullámhosszmaximumának kék-, illetve vörös eltolódását eredményezi, az oldószer polaritásától függően (szolvatokromizmus). Hasonlóan az oldószer hatásához, töltött részecskék (fémionok, összetett ionok, töltött szerves vegyületek) is kiválthatják az emissziós maximum eltolódását. Mivel e töltött részecskék a vizsgálandó rendszerekben általában kis mennyiségben vannak jelen, fontos ezek koncentrációja a fluorofór csoport környezetében. Az adott töltött részecske (Guest) ilyen célból való „befogása” megfelelően tervezett receptoregységekkel megvalósítható. Fontos, hogy a kellő hatás érdekében a fluorofór egység gerjesztett állapotban parciális töltéssel rendelkező része minél közelebb legyen a receptor által megkötött ionhoz. Az ICT típusú szenzorvegyületek felépítésükből adódóan teljesítik ezt a megkötést, amennyiben a receptor és a fluorofór modul egymásnak integrált része (2. ábra).



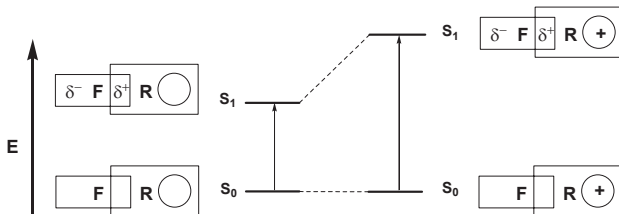
2. ábra. ICT szenzorok szerkezeti felépítése

A szenzorcsalád alkalmazásával sikerrel valósították meg H^+ (**4**)⁷, Ca^{2+} (**2**)⁷, (**5**)¹⁷, Na^+ (**3**)⁷ és Mg^{2+} (**5**)⁷ - ionok különböző koncentrációban történő kimutatását fiziológiai körülmények közt,¹⁸ (3. ábra). Ugyancsak az ICT szenzorok sajátosságait használták ki logikai kapcsolóként is alkalmazható vegyületek esetében.¹⁹



3. ábra. Példák ICT szenzorokra

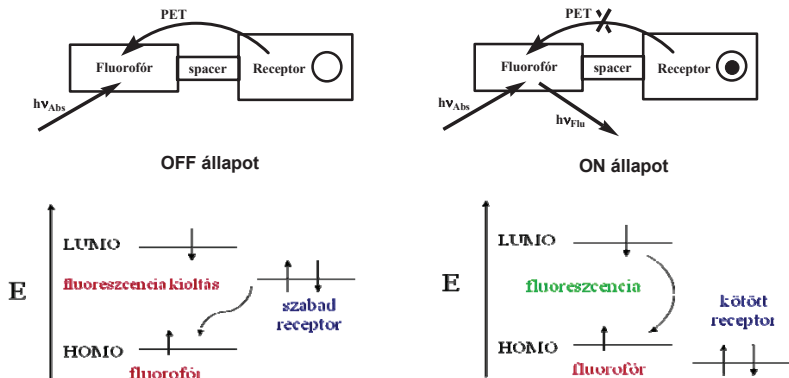
A kimutatni kívánt, a receptor által megkötött, töltéssel rendelkező guest a töltésének megfelelően stabilizálja, vagy destabilizálja a gerjesztett állapotot, annak megfelelően, hogy a receptor környezetében milyen parciális töltést vesz fel a fluorofór a gerjesztett állapotban. Taszító kölcsönhatások esetében a destabilizált gerjesztett állapot kialakulása kék (4. ábra), míg vonzó kölcsönhatások esetében kialakuló stabilizált S_1 állapot esetében az emissziós spektrum maximuma a vörös tartomány felé tolódik el. Ugyancsak a gerjesztett állapotban fellépő taszító és vonzó kölcsönhatások számlájára írható az alapállapothoz képest eltérő (nagyobb, vagy kisebb) komplex stabilitási állandó.



4. ábra. Kation hatása az ICT szenzorok gerjesztési spektrumára

3.2. Fotoindukált elektrontranszfer (PET) szenzorok

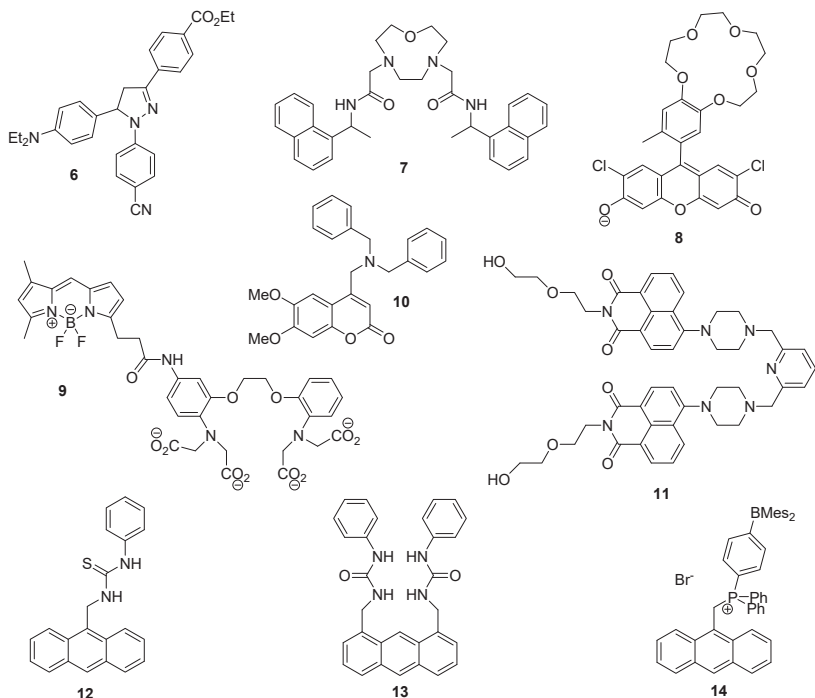
A fotoindukált elektrontranszfer (PET) szenzorcsalád felépítésére jellemző, hogy szemben az előző szakaszban tárgyalt ICT szenzorokkal bennük a receptor és a fluoreszcens egység egy átkötő (spacer) egységgel elválasztva, térben elkülönülten helyezkedik el.^{7,20} A receptor (*host*) gyakran nagyobb méretű, összetett szerkezetű molekula (koronaéter, kriptand, kalixarén vagy ciklodextrin). A jeladó (*fluorofór*) csoport szintén igen változatos szerkezetű lehet. A távtartó gyakran metilén csoport, míg a receptorban található elektrongazdag részlet gyakran egy nitrogénatom nemkötő elektronpárja. Működési mechanizmusukra jellemző, hogy a receptoregységben levő elektrondonor atom, vagy atomcsoport, a fluoreszcens modul gerjesztett állapotát redukálni képes (fotoindukált elektrontranszfer), gátolva ezzel annak fluoreszcenciával történő relaxációját (OFF állapot). A guest megkötésekor megváltozik az elektrondonor atom, vagy atomcsoport redukációs potenciálja, minek következtében már nem képes a fluoreszcencia elektrontranszfer útján való kioltására, így a fluoreszcencia intenzitása megnövekszik (ON állapot)^{7,21} (5. ábra). A szakirodalomban ennek ellentétes esete is megtalálható, azaz olyan eset, amikor a guest megkötése segíti elő a fluoreszcencia kioltását (ON-OFF szenzor).²²



5. ábra. A PET szenzorok működési elve

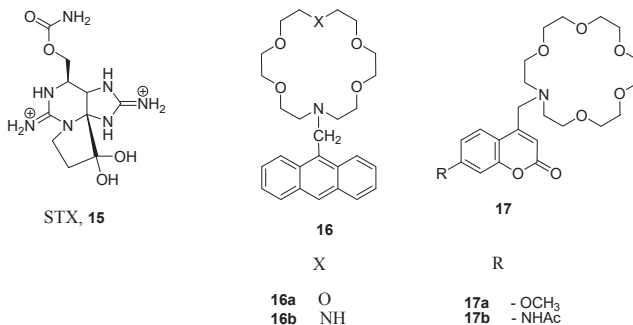
A PET szenzorok alkalmazási köre igen változatos.^{20,23} A vendégmolekulák szintén többfélék lehetnek. A legegyszerűbb esetben a H^+ (**6**)^{23a}, alkáli- és alkáliföldfémek (Li^+ (**7**)^{23a},

Na^+ (**8**)^{23a}, Ca^{2+} (**9**)^{3a}), átmeneti fémek (Zn^{2+} (**10**)^{23a,21}, Hg^{2+} (**11**)^{23a}), valamint anionok (AcO^- , H_2PO_4^- (**12**)²⁴, F^- (**13**)²⁵, CN^- (**14**)²⁶) (6. ábra) szelektív kimutatására is alkalmazzák őket. Szerencsés esetben többféle vendégmolekula jelenlétében is szelektív molekuláris felismerést tapasztalhatunk. A PET szenzorok nemcsak töltéssel rendelkező egyszerű ionok, hanem semleges vegyületek, például aminosavak²⁷, cukrok²⁸ meghatározására is alkalmasak.



6. ábra. Példák PET szenzorokra

Egyes fluoreszcens koronaéter-származékok²⁹ (**16a,b**; **17a,b**) a tengeri élőlények által termelt idegmérgek^{30,31,32,33} (pl. saxitoxin, **15**) detektálására (7. ábra) is sikeresen alkalmazhatóak.³⁴ A feltételezések szerint e molekulák koronaéter része receptorként funkcionál. A toxin kötődése olyan változást indukál a koronaéterhez kapcsolódó fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező csoport elektronszerkezetében, amelynek következményeként a fluoreszcens jel intenzitása a többszörösére növekszik (*jelátalakítás*).

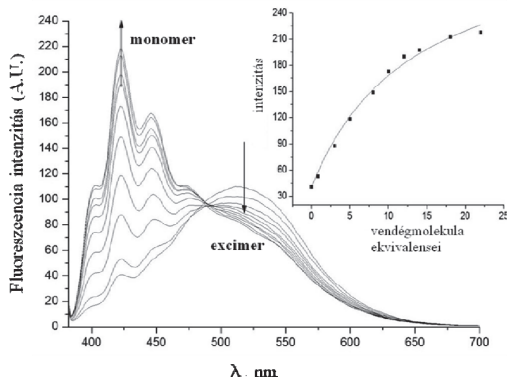


7. ábra. Saxitoxin és detektálására alkalmas szenzorok

Itt jegyzendő meg, hogy a bevezetőben említett működési anomáliákat itt került először említésre az irodalomban³⁴. Szimulációs - dokkolási - kísérletek eredményei ugyanis azt mutatták, hogy a koronaéterben jelenlevő elektrondonorként szereplő N-atom nem vesz részt a komplexálási folyamatban. Ez a megfigyelés indította el azon kutatásainkat, melyek egy második (nem a közvetlen koordináción alapuló) mechanizmus felderítését célozták meg.

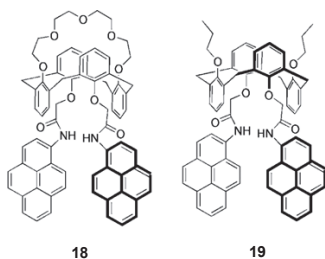
3.3. Excimer szenzorok

A fluoreszcens szenzorok e típusában egynél több fluorofór egység található. Jellemző rájuk, hogy a fluoreszcens egységek a gerjesztett állapotban egy gerjesztett dimert (excimer) képeznek, melynek fluoreszcenciája egy második, erősen a vörös tartomány felé eltolt széles, strukturálatlan sávként jelenik meg (8. ábra).^{7,35}



8. ábra. Monomer-excimer sávok intenzitásarányának változása a vendégmolekula adagolásának hatására

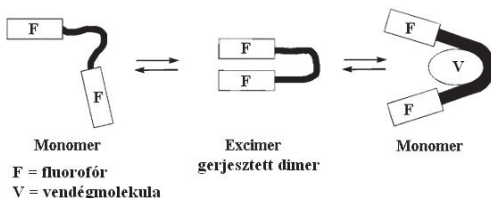
Az excimer oly módon jön létre, hogy az egyik fluorofór gerjesztett állapota során egy alapállapotú - ugyanolyan - fluorofórral gerjesztett állapotú dimert képez. Ez a dimer egyensúlyt tart fenn a monomer formával, így a spektrumban mind a két sáv megfigyelhető. Excimer akkor keletkezhet a gerjesztett monomerből, ha annak életidején belül létrejön a kölcsönhatás. Ugyancsak elengedhetetlen feltétel az excimer kialakulásához a fluorofór csoportok π -pályái közti kölcsönhatás³⁶ – például antracén, pirén (**18,19**) esetében – létrejötte, azaz a két fluorofór kedvező térállása, átfedése (9. ábra).



9. ábra. Excimer szenzorok fluorofór csoportjainak kedvező térállása

Az excimer típusú szenzorok receptor egysége úgy van kialakítva, hogy a vendégmolekula megkötése meggátolja az excimerképződést (10. ábra). A komplexálódás így

a monomer – excimer sáv intenzitásarányának változásából követhető (8. ábra). A kialakuló excimer létrejöhet intra- és intermolekuláris módon is. Amennyiben intramolekuláris a kölcsönhatás jellege, akkor a két sáv (monomer és excimer) aránya a szenzorkoncentrációtól független és egy adott vendégmolekula-koncentrációra jellemző érték, ami megbízhatóbb detektálást tesz lehetővé, mivel a fluoreszcens sávok intenzitása változhat és szórhat a mérések során. Ebben az esetben a vegyület alkalmazható excimer szenzorként. Amennyiben intermolekuláris excimer alakul ki, a két sáv intenzitásának aránya koncentrációfüggést mutat, ekkor a vegyület nem használható excimer szenzorként.



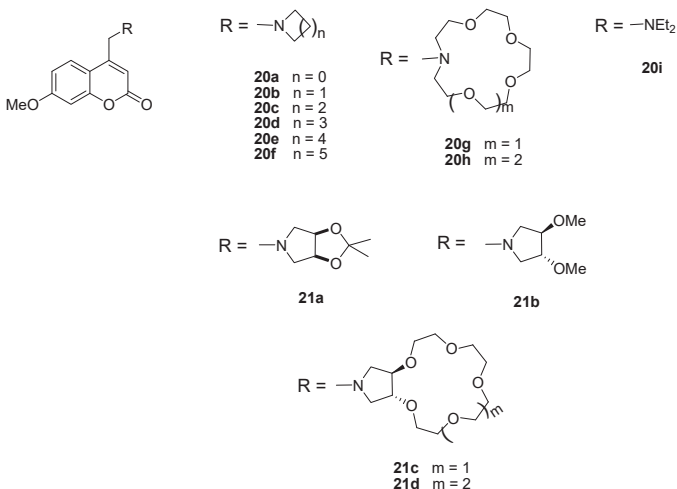
10. ábra. A vendégmolekula hatása az excimer szenzorra

3.4. Célkitűzések

A PET szenzorok működési mechanizmusával kapcsolatos, elfogadott elmélet szerint a vendégmolekuláknak az elektrondonor atomhoz, atomcsoporthoz való direkt koordinációjának következtében változik a fluoreszcencia intenzitása. Ez az elmélet azonban nem ad kielégítő magyarázatot minden esetben, amint azt a saxitoxin detektálása során megfigyelt jelenség leírásakor említettük.^{34,37} A csoportunkban folyó kutatásaink során azt tapasztaltuk, hogy a fluoreszcens szenzorban található elektrongazdag részlet mobilitása szintén erősen befolyásolja a fluoreszcens jel intenzitását.³⁸ Ezen kutatások rávilágítottak egy másik, konformációs dinamikán alapuló mechanizmus létezésére is, mely bizonyos esetekben kizárólagos, míg más esetekben a hagyományos működési mechanizmussal párhuzamosan járul hozzá a jel kialakításához. Ezt a megállapítást tovább vizsgálendő olyan vegyületeket kívántunk előállítani, és vizsgálni, melyek működésére a konformáció különböző mértékben van hatással. Kísérleteinkhez olyan 1,10-diaza-18-korona-6-éter receptort tartalmazó PET típusú szenzorokat terveztünk, melyek különböző szubsztituenseket tartalmaznak.

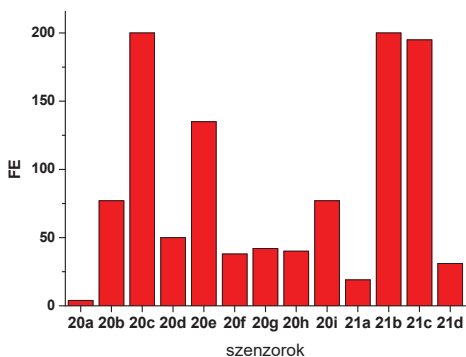
3.5. Saját eredmények – Fluoreszcens szenzorok (előzmények)

Az irodalmi bevezetőben megismert PET szenzorok közös tulajdonsága, hogy a vendégmolekula kötődésének hatására megszűnik a fotoindukált elektrontranszfer (PET) folyamat, ami a fluoreszcens jel felerősödését eredményezi. A detektált jel intenzitásváltozása annál jelentősebb minél hatékonyabb a receptor üres állapotában lejátszódó fotoindukált elektrontranszfer folyamat. A receptorrészebe integrált elektrondonor csoport gyakran N-atom, melynek nemkötő elektronpárjáról kiinduló redukciós folyamat biztosítja a fluoreszcencia kioltását. Az elektronikus hatások azonban nem minden esetben magyarázzák a komplexálódás során megfigyelhető jelintenzitás-növekedést, ami a konformációs változások PET-folyamatra gyakorolt szerepét valószínűsíti. A jelenség vizsgálatának érdekében előállítottunk olyan N-metilén-kumarin szenzorokat, amelyekben a fluoreszcencia letöréséért felelős nitrogénatom különböző tagszámú telített gyűrűk részeként szerepelt (**20a-f**) (11. ábra).



11. ábra. *A N-atom konformációs szabadságának vizsgálata érdekében előállított vegyületcsalád*

A protonálás hatására bekövetkező fluoreszcencia serkentések (12. ábra; 1. táblázat) vizsgálata során arra az érdekes felismerésre jutottunk, hogy a PET folyamat hatékonysága jelentősen függ a nitrogénatomot tartalmazó gyűrű szerkezetétől. Ugyancsak vizsgáltuk a fluoreszcencia változását nyílt láncú (**20i**), illetve koronaéter-származékok (**20g,h**) esetében is. Az eredmények rávilágítottak arra, hogy a fluoreszcenciaerősítés mértéke akkor a legnagyobb, ha a kérdéses nitrogénatom egy öttagú (pirrolidin) gyűrű (**20c**) részeként szerepelt. Ezt követően vizsgáltuk, hogy a pirrolidin konformációs szabadsági fokainak változásai vajon hogyan befolyásolják a jelátviteli folyamat hatékonyságát. A pirrolidingyűrű mozgékonyságának korlátozását egy acetamid egység (**21a**) bevitelével oldottuk meg. A protonálás hatására bekövetkező fluoreszcencia növekedés mértéke ebben az esetben a tized részére csökkent, azaz a jelátviteli folyamat hatékonysága nagymértékben függ a pirrolidingyűrű konformációs szabadságától. Dimetoxi-pirrolidint tartalmazó származékkal (**21b**) elvégzett kísérlet során igazoltuk, hogy a csökkent jelátvivő képesség nem a pirrolidinhez kapcsolt szubsztituensek hatására következett be. A fenti eredmények vezettek olyan kumarilmetil-pirrolidin szenzorok tervezéséhez és előállításához, ahol a pirrolidin egységhez receptorként 15-korona-5 (**21c**), illetve 18-korona-6 egységeket (**21d**) kapcsoltunk.

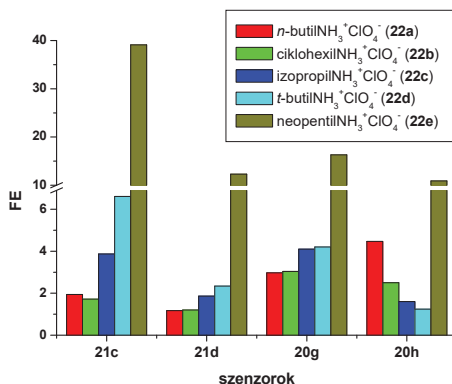


12. ábra. A szenzorok jelerősítése savfelesleg hatására MeCN-ben ($FE=I/I_0$)

	20a	20b	20c	20d	20e	20f	20g	20h	20i	21a	21b	21c	21d
H ⁺	3,9	77	200	50	135	38	42	40	77	19	200	195	31

1. táblázat. A szenzorok jelerősítése savfelesleg hatására MeCN-ben ($FE=I/I_0$)

Ezekről a szenzorokról olyan működési mechanizmust reméltünk, amelynek során a koronaéterben a vendégmolekula bekötése által okozott konformációs változások átadódnak a pirrolidingyűrűre, megváltoztatva ezzel annak a fluoreszcenciát letörő képességét, így növelve a fluoreszcencia intenzitásának növekedését. Elsőként vizsgáltuk a két új szenzornak a protonálódás hatására bekövetkező fluoreszcencia serkentését. Megállapítottuk, hogy míg a kisebb méretű receptort tartalmazó vegyület (**21c**) esetében a jelátviteli képesség nem változott a korábban vizsgált, pirrolidint tartalmazó szenzor esetében tapasztaltnál képest, a nagyobb receptort hordozó jelzőmolekula (**21d**) esetében annak egyötöd részére csökkent (12. ábra; 1. táblázat). Ez arra engedett következtetni, hogy a két, eltérő méretű koronaéter különböző térszerkezete következtében másképpen torzítja a pirrolidingyűrűt. Megvizsgáltuk a jelátadás hatékonyságát (13. ábra; 2. táblázat) a két újfajta szenzor (**21c,d**) esetében, különböző térigényű ammóniumsók (**22a-e**), mint vendégmolekulák jelenlétében. A feltételezett mechanizmusnak megfelelően azt reméltük, hogy a nagyobb méretű ammóniumsók nagyobb mértékű torzulásokat idéznek elő mind a koronaéterben, mind a pirrolidin egységben. Megállapítottuk, hogy a két szenzor hasonlóan viselkedik az ammóniumsók jelenlétében, azzal a kivétellel, hogy a jobb jelzőképességgel rendelkező, kisebb receptort tartalmazó szenzor esetében sokkal nagyobb intenzitásváltozásokat tapasztaltunk.



13. ábra. **21c**, **21d**, **20g**, **20h** szenzorok jelerősítése különböző ammónium perklorátok (**22a-e**) jelenlétében ($FE=I/I_0$)

	22a	22b	22c	22d	22e
21c	1,94	1,72	3,87	6,61	39,1
21d	1,17	1,20	1,86	2,34	12,3
20g	2,97	3,04	4,10	4,20	16,3
20h	4,47	2,50	1,60	1,24	10,9

2. táblázat. 21c, 21d, 20g, 20h szenzorok jelerősítése különböző ammónium perklorátok (22a-e) jelenlétében ($FE=I/I_0$)

Várakozásainknak megfelelően az ammóniumsók növekvő térigényével nőtt a megfigyelhető fluoreszcencia-serkentések mértéke. A kísérleteket elvégeztük hagyományos szerkezetű, 18-as (**20h**) és 15-ös (**20g**) méretű aza-koronaéter szenzorokkal is. Az eredmények azt mutatták (13. ábra), hogy a kisebb méretű receptort tartalmazó azakorona szenzor esetében az ammóniumsók méretével nőtt a serkentés mértéke. Ezzel szemben az aza-18-korona-6 éter származéknál (**20h**) nem a sók mérete, hanem azok H-híd donor képessége (savassága) a meghatározó faktor. Az aza-15-korona-5 étert tartalmazó szenzor (**20g**) esetében pedig kevert hatásokra következettünk.

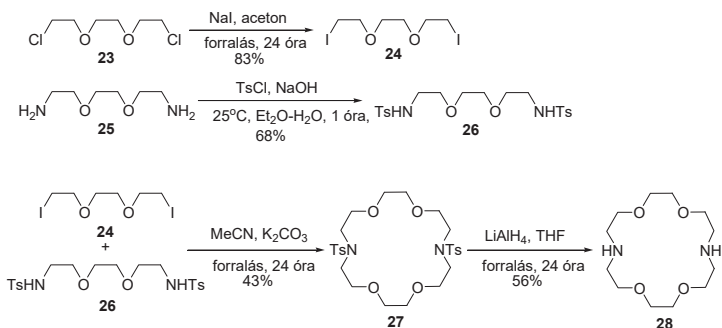
A vizsgálatokból arra következettünk, hogy az elfogadott elmélettel szemben, amely szerint a vendégmolekuláknak a nitrogénatomhoz való direkt koordinációjának következtében változik a fluoreszcencia intenzitása, egy másik mechanizmus is felelős lehet a fluoreszcencia növekedéséért. Ez a másik mechanizmus a konformációs változások következménye. Valószínűsítjük, hogy a két hatás együttesen felelős a tapasztalható fluoreszcencia serkentésért, a szenzor típusától függően különböző mértékben hozzájárulva ahhoz. Az előállított két újfajta szenzor (**21c,d**) esetében pl. a közvetlen koordinációból adódó hatások kizárhatók, itt tisztán a konformációs hatások érvényesülnek. A hagyományos szerkezetű, kisebb receptorméretű azakorona szenzornál (**20g**) a két mechanizmus együttesen fejti ki hatását, a konformációs mechanizmus túlsúlyával. A nagyobb receptorméretű azakorona származék (**20h**) esetében a koordinációs hatás túlsúlya figyelhető meg.

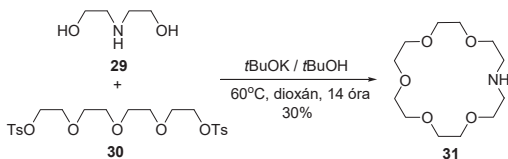
Kutatási eredményeink további vizsgálata érdekében, olyan diaza-koronaéter származékokat terveztünk, amelyeken a konformációs dinamika szerepe tettenérhető.

3.5.1. Fluoreszcens szenzorok szintézise – A konformáció szerepének vizsgálata

Doktori munkám közvetlen előzményeként tekinthető az előzményekben említett új, a konformációs változásokra érzékeny szenzorcsalád vizsgálata, melynél igazoltuk, hogy a nitrogénatom környezetének mozgékonyasága hatással van a szenzorvegyületek jelerősítési folyamataira. Ezt a jelenséget más vegyületeknél is igyekeztünk tetten érni, ennek érdekében több 1,10-diaza-korona-6-éter receptorról rendelkező szenzort állítottunk elő. A két nitrogénatomnak köszönhetően a receptor variálhatósága megnőtt, mono- és diszubsztituálható, különböző térigényű csoportok építhetők be. Az összehasonlíthatóság érdekében a megfelelő tagszámú, monoaza-koronaéter receptorról rendelkező vegyületet is elkészítettük. Fluorofór csoportként ismét kumarin származékot alkalmaztunk, mivel hatékony, variálható, poláros csoport, ezért származékait gyakran alkalmazzák a szenzorfejlesztésben.³⁴ A diaza-koronaéter receptort és a fluorofór egység bevitelére alkalmas kumarinszármazékot, bár kereskedelmi forgalomban kaphatóak, magam állítottam elő.

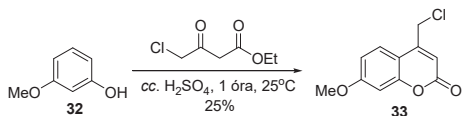
Az 1,2-bisz(2-klór-etoxi)etánt (**23**) a reaktivitás növelése érdekében, nátrium-jodiddal a megfelelő jódszármazékká alakítottuk (**24**), majd ezt reagáltattuk az 1,8-bisz(*p*-tolil-szulfonilamino)-3,6-dioxaoktánnal (**26**). A reakció termékeként az 1,10-diaza-18-korona-6-éter tozil-csoporttal védett származékát kaptuk (**29**). A tozil-csoportokat lítium-alumínium-hidrides redukcióval távolítottuk el, így jutva a szenzor receptor részét adó származékhoz (**28**). A monoaza-18-korona-6-étert (**31**) jóval egyszerűbb módon kaptuk, dietanol-amin (**29**) és tetraetilenglikol-ditozilát (**30**) reakciójával mérsékelt kitermeléssel (14. ábra).



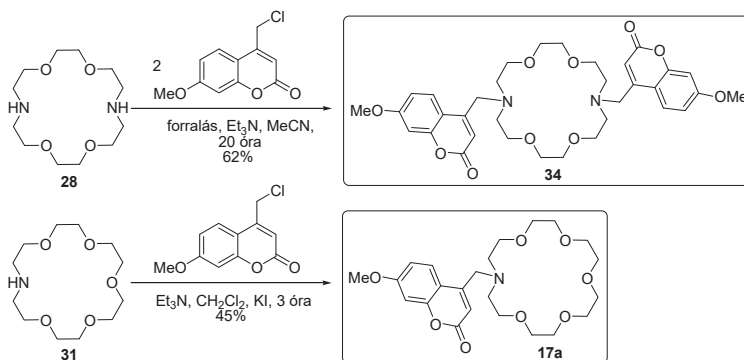


14. \u00e1bra. Aza-korona\u00e9ter vegy\u00fcletek (receptorok) el\u00f3\u00e1llítása

A fluorof\u00f3r csoport bevitel\u00e9hez sz\u00fcks\u00e9ges kl\u00f3rmetilkumarin-sz\u00e1rmaz\u00e9kot (**33**), 3-metoxi-fenol (**32**) \u00e9s etil-kl\u00f3racetacet\u00e1t elektrofil szubsztit\u00faci\u00f3j\u00e1val \u00e1llítottuk el\u00f3 \u00fan. Pechmann kondenz\u00e1ci\u00f3s reakci\u00f3ban (15. \u00e1bra).³⁹ Az 1,10-diaza-18-korona-6-\u00e9tert (**28**) \u00e9s k\u00e9t ekvivalens kl\u00f3r-kumarint (**33**) acetonitrilben 20 \u00f3ran keresztül forralva - trietilamin jelenl\u00e9t\u00e9ben - kaptuk az el\u00f3 c\u00e9lvegy\u00fcletet (**34**) 62%-os kitermel\u00e9ssel. A monoaza-18-korona-6-\u00e9tert (**31**) \u00e9s a kl\u00f3r-kumarint szobah\u00f3m\u00e9rs\u00e9kleten dikl\u00f3rmet\u00e1nban reag\u00e1ltatva - trietilamin \u00e9s k\u00e1lium-jodid jelenl\u00e9t\u00e9ben - jutottunk a m\u00e1sodik c\u00e9lmolekul\u00e1hoz (**17a**) (16. \u00e1bra).

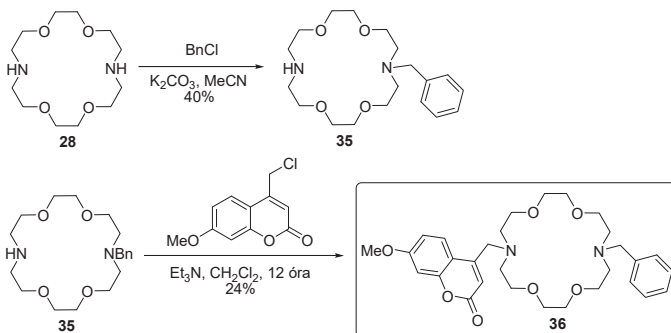


15. \u00e1bra. Kumarin sz\u00e1rmaz\u00e9k (fluorof\u00f3r) el\u00f3\u00e1llítása



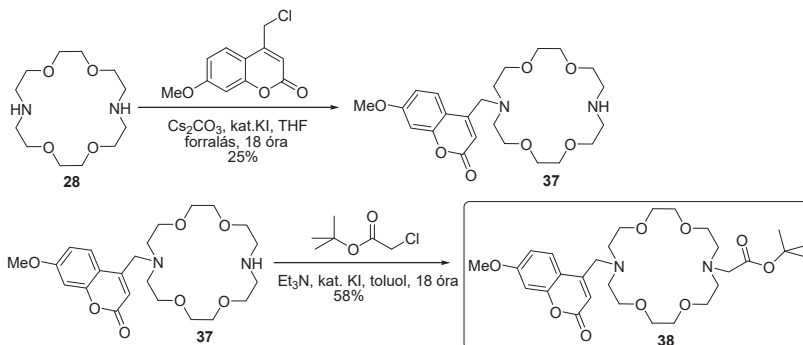
16. \u00e1bra. Szenzormolekul\u00e1ink el\u00f3\u00e1llítása I.

A két fluorofórt tartalmazó szimmetrikus molekula (**34**) mellett aszimmetrikusan szubsztituált korona-éter származékokat is előállítottunk (17-18. ábra). Irodalmi példát követve⁴⁰ sikeresen monobenzileztük az 1,10-diaza-18-korona-6-étert, majd a terméket a **33**-as vegyülettel diklórmetánban forralva – trietil-amin jelenlétében – jutottunk a **36**-os célvegyülethez (17. ábra).



17. ábra. Szenzormolekuláink előállítása II.

A **38**-as célvegyülethez az 1,10-diaza-18-korona-6-éter prekuzort (**28**) előbb a klórmetil-kumarin származékkal, majd a *t*-butil-klóracetáttal reagáltatva jutottunk (18. ábra).

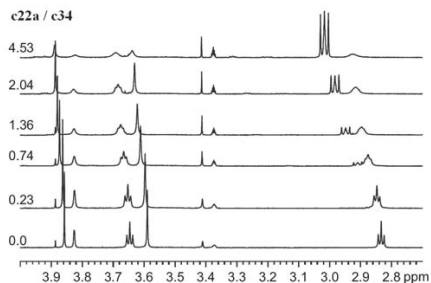


18. ábra. Szenzormolekuláink előállítása III.

3.5.2. NMR-titrálások

A klasszikus PET-szenzorok működési elvének megfelelően az aza-koronaéter N-atomjának nemkötő elektronpárja blokkolja a kumarin csoport lumineszcenciáját mindaddig, amíg a receptor szabad állapotban van. A hagyományos elmélet szerint a komplexálódás hatására a donor nitrogén redox potenciálja megnő, gyengítve ezzel annak elektrondonor képességét. Ezen változás vezet a fluoreszcens jel intenzitásának megnövekedéséhez. Vendégmolekulának ismét az előzményekben már megismert különböző térigényű és elektronigényű, de azonos módon kötődő ammónium perklorát sókat (**22a-e**) választottuk – *n*-butil- (**22a**), ciklohexil- (**22b**), izopropil- (**22c**), *t*-butil- (**22d**) és neopentilammónium (**22e**) perklorát.

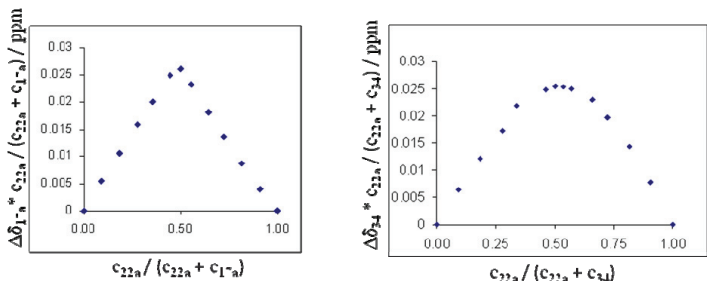
A vendégmolekula és a receptor közti kötődés erősségének vizsgálatát ^1H -NMR mérések segítségével végeztük, amit együttműködés keretében a Semmelweis Egyetemen végeztek. A 19. ábrán jól látható, hogy a jelek eltolódásváltozása szignifikáns, és jól követhető a vendégmolekula adagolásának hatására. A méréseket $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 90/9/1 *V/V/V*% rendszerben hajtottuk végre, 25°C-on.



19. ábra. 34 szenzor ^1H -NMR (600MHz) spektrumának változása *n*-butilammónium vendégmolekula adagolásának hatására

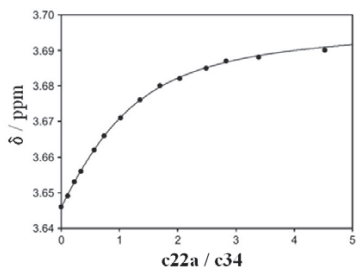
Első lépésként a vendégmolekula - receptor komplex sztöchiometriáját állapítottuk meg. Ehhez az ún. Job-féle módszert alkalmaztuk. A módszer jellegzetessége, hogy a vendégmolekula-szenzor molarányának függvényében ábrázolva a komplexálódás hatására létrejövő változást – szintén a molaránnyal súlyozva – olyan görbét kapunk, melynek maximumából leolvasható a komplex sztöchiometriája. Ez a változás a detektálástól függően lehet kémiai eltolódás-változás, fluoreszcencia intenzitás-változás⁴¹ stb. A referenciaként

vizsgált **17a** és a szimmetrikus, két fluorofórt tartalmazó **34**-es szenzor esetében vizsgáltuk meg a komplex sztöchiometriát (20. ábra).



20. ábra. **17a** és **34** szenzor *n*-butilammónium vendégmolekulával (**22a**) képzett komplex sztöchiometria meghatározása a koronaéter *O*-CH₂ jelei alapján
($c_{\text{szenzor}} + c_{\text{vendég}} = 1 \text{ mM}$)

Mindkét esetben a 0,5-ös mólarányánál jelentkező maximum az 1:1 komplex (szenzor-vendégmolekula) sztöchiometriát támasztja alá. Érdekes megfigyelni a két görbe alakja közti különbséget. Az összehasonlításra használt **17a** esetében sokkal élesebb, míg a **34** szenzornál laposabb a görbe. A különbség a két görbe alakjában a különböző komplex stabilitási állandókra vezethető vissza. Minél nagyobb a komplex stabilitási állandója, annál élesebb a töréspont a maximum helyén. NMR-titrálások segítségével a szenzor-vendégmolekula komplex stabilitási állandója is meghatározható követve az eltolódásokat a vendégmolekula-szenzor koncentráció-hányadosának függvényében (21. ábra).



21. ábra. **34** szenzor (*O*-CH₂ jelek) szignifikáns eltolódásváltozása *n*-butilammónium vendégmolekulával végzett titrálás hatására

A komplex stabilitási állandót a következő **(17a,34,36)** szenzor - **(22a,d,e)** vendégmolekula (komplex) párokra állapítottuk meg (3. Táblázat).

	17a	34	36
22a	6.00 (1)	3.53 (3)	4.54 (2)
22d	4.62 (3)	2.75 (8)	4.53 (3)
22e	5.23 (8)	2.84 (8)	5.06 (5)

3. táblázat. *A komplexek stabilitási állandóinak logaritmusai (log K) (zárójelben a standard deviáció mértéke)*

A vizsgált szenzorok közül a referenciának választott **17a** kötötte legerősebben az ammónium ionokat, a **34** pedig legkevésbé. A **36** esetében köztes értékeket mértünk, mely értékek közelebb álltak a **17a** vegyület esetében tapasztalt értékekhez. A különböző ammónium-sókkal mutatott komplex stabilitási állandókra nézve egyértelmű tendenciát nem tudtunk megállapítani, de azt kijelenthetjük, hogy komplex stabilitási állandók egyenesen arányosak az ammóniumsók hidrogénhid-donor tulajdonságával. Érdeemes megjegyeznünk, hogy a két fluorofórt tartalmazó szenzor esetében mintegy 2 nagyságrenddel gyengébb a komplex stabilitása az egy fluorofórt tartalmazóhoz képest.

3.5.3. Fluoreszcens mérések

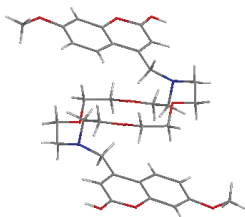
A vizsgált diaza-koronaszármazékok esetében tanulmányoztuk a fluoreszcencia-serkentéseket is vendégmolekulák jelenlétében. A **34** szenzornál vizsgáltuk először a fluorofórok intra-, és intermolekuláris dimerizációjának lehetőségét (excimerképződés). Megállapítást nyert, hogy a fluorofórok kizárólag intermolekuláris dimereket képeznek mivel az excimerre jellemző sáv intenzitása koncentrációfüggést mutatott. Az excimerképzést kizáró a további kísérleteket 10^{-6} mol/dm³-es szenzorkoncentráció-tartományban végeztük, ahol a dimerizálódás mértéke elhanyagolható.

A PET-folyamat hatékonyságának megállapításához megmértük a tanulmányozott szenzorok maximális fluoreszcens jelerősítését, amit protonálódás, feleslegben alkalmazott HBF₄ hatására figyelhetünk meg (4. táblázat). A protonálódással a PET-folyamat tökéletes kikapcsolását érjük el.

Szenzor	17a	34	36	38
FE	38	135	149	169

4. táblázat. A szenzorok jelerősítése savfelesleg hatására MeCN-ben ($FE=I/I_0$)

Minden vizsgált diaza-koronaéter receptorral rendelkező szenzor (**34,36,38**) esetében 3-4-szer nagyobb szignált tapasztaltunk a **17a** referencia vegyülethez képest függetlenül a fluorofór csoportok számától. Ezen jelenség összhangban áll a szakirodalomban leírt hasonló rendszerek esetében megfigyelt jelzőképességgel⁴². A **17a** esetében megfigyelhető gyengébb jelzőképesség magyarázható egyrészt a nem protonált formában jelen levő kevésbé hatékony PET folyamattal. Ugyanakkor felmerül annak lehetősége is, hogy a két kromofór dimerképződés mellett oltja ki egymás fluoreszcenciáját (self-quenching). Ehhez elengedhetetlen a két fluorofór egység azonos oldali, cisz térállása. Ez egyrészt a monomerre jellemző fluoreszcens jel kioltásához vezet, amely mellé társulhat egy vörös tartomány felé eltolódott ún. excimer sáv megjelenése is. E lehetőséget elvetettük, hiszen a spektrofluoreszcenciás mérések igazolták, hogy nem történik excimerképződés. Ugyancsak a szubsztituensek transz térállását támasztja alá a 34 vegyület röntgenkrisztallográfiai szerkezete is (22. ábra), mely a koronaéter-síkhöz képest a kromofórok transz helyzetű elhelyezkedését mutatja.

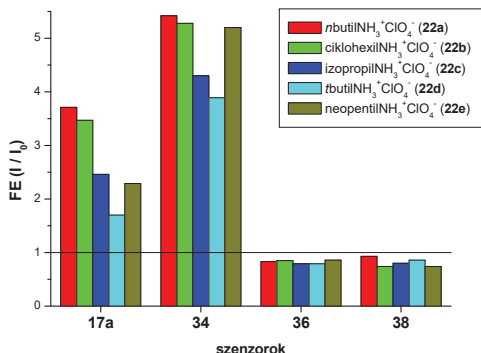


22. ábra. 34 szenzor röntgen-szerkezete

Felmerül továbbá annak lehetősége is, hogy a diazakorona éter származékok esetében megfigyelhető nagyobb jelzőképesség a konformációs dinamika számlájára írható. A közvetlen előzmények fejezetben megállapítottuk, hogy az elektrondonor rész mozgékonyasága vagy épp merevsége alapvetően meghatározza a fluoreszcens jelerősítés

értékét. Ez alapján feltételezzük, hogy a diaza-koronaéter konformációs szabadságát korlátozva statisztikailag megnöveljük az olyan konformerek előfordulási valószínűségét, amelyekben hatékonyabb a fluoreszcens jel kioltása. Ezek alapján a **17a** vegyület csökkent jelerősítése annak köszönhető, hogy egy szubsztituens kevésbé korlátozza a 18-tagú gyűrűrendszer mobilitását, mint kettő.

Koordinációs kísérleteket végeztünk a már említett különböző, *n*-butil-, ciklohexil-, izopropil-, *t*-butil-, neopentil-ammónium perklorátokkal (**22a-e**), melyeknél ismét szem előtt kell tartanunk hasonló kötődésmódjuk mellett az eltérő térigényt. Összehasonlítva az egy fluorofórral rendelkező **17a**, és a két fluorofórral rendelkező **34** vegyület esetében mért fluoreszcenciaerősítés értékeket hasonló tendenciát figyelhetünk meg, azzal a különbséggel, hogy a **34**-es szenzor minden esetben szignifikánsan magasabb intenzitást produkált (23. ábra). Ez különösen figyelemreméltó annak tudatában, hogy a kialakuló komplex stabilitási állandója két nagyságrenddel kisebb a diaza-koronaéter receptorral rendelkező **34**-es vegyület esetében.



23. ábra. **17a, 34, 36, 38** szenzorok FE értéke különböző ammónium perklorátok **22a-e** jelenlétében (oldószer: 1% MeOH CH₂Cl₂-ban)

A **17a** és **34** vegyületeknél tapasztalt hasonló trend megfelel az alkalmazott ammónium sók protondonor képességének. Az *n*-butilammónium ion a legsavasabb, ez képes a legerősebb hidrogén-híd kialakítására, így nem meglepő a magas FE érték. Ebből a sorból kiugrani látszik a neopentilammónium ion erősítés értéke, azonban tudnunk kell, hogy a *n*-butilammónium és neopentilammónium ion savassága hasonló mértékű. A **36** és **38** szenzor

esetében a vendégmolekulák jelenlétében meglepő módon kisebb mértékű, reprodukálható csökkenés figyelhető meg. (5. táblázat)

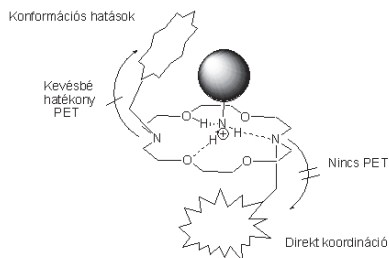
	22a	22b	22c	22d	22e
17a	3,71	3,47	2,46	1,70	2,29
34	5,42	5,28	4,30	3,89	5,20
36	0,83	0,85	0,79	0,79	0,86
38	0,93	0,74	0,80	0,86	0,74

5. táblázat. 17a, 34, 36, 38 szenzorok fluoreszcenciaerősítése
különböző ammónium perklorátok
(22a-e) jelenlétében (oldószer: 1% MeOH CH₂Cl₂-ban)

A hasonló tendencia mellett a **17a** és a **34**-es vegyület között megfigyelhető különbséget a konformációs dinamika jelenlétével értelmeztük. A szimmetrikusan szubsztituált származék esetében hangsúlyosabb a komplexálódás miatt a HOST szerkezetében bekövetkező konformációváltozás. A különbség magyarázatául azt valószínűsítjük, hogy a **17a** szenzor esetében a GUEST molekulák szabadon hozzáférhetnek a HOST receptoregységéhez, míg a **34** esetében ez csak úgy lehetséges, ha a komplexálódást megelőzi az egyik kumarin egység térbeli elmozdulása. A vizsgálati eredmények alátámasztják, hogy a **34** esetében nagyobb mértékű a szerkezetbeli torzulás, mint a **17a** rendszernél ($\Delta\delta$ értékek). Hipotézisünk alapján a **34**-nél megfigyelhető fluoreszcencia serkentés így két komponensből tevődik össze:

- a,) a nitrogénatomhoz történő direkt koordináció (**17a**-nál kizárólagos mechanizmus)
- b,) az ellenoldali nitrogén környezetének mozgásszabadság-változása (24. ábra)

Ezen magyarázat alapján a **34**-es szenzorban mindkét fluorofór bekapcsol, különböző mértékben, így ennél a vegyületnél a kumulatív hatás eredményeként nagyobb fluoreszcencia serkentéseket figyelhetünk meg annak ellenére, hogy nagyságrendekkel gyengébben képes az ammóniumsók koordinálására, mint a **17a**.



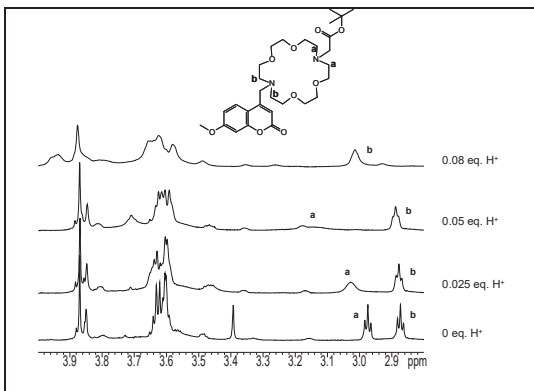
24. ábra. 34 szenzor működési mechanizmusa

A vendégmolekulák okozta szerkezeti változás további bizonyítéka a $^1\text{H-NMR}$ eltolódásbeli különbségek **17a** és **34** esetén (a N-CH_2 jeleket vizsgálva) (6. táblázat). Kétségtelenül a nagyobb térigényű vendégmolekula okoz nagyobb változást, és itt is a **34** vegyület reagál érzékenyebben, ami szintén alátámasztja a konformáció szerepét hangsúlyozó magyarázatunkat.

	17a	34
22a	0,052	0,112
22e	0,061	0,228

6. táblázat. $^1\text{H-NMR}$ maximális kémiai eltolódásváltozások ($\Delta\delta$) **17a** és **34** esetén 5 ekv. vendégmolekula hatására (az N-CH_2 jeleket vizsgálva)

Vizsgálatainkat kiterjesztve a másik két diaza-koronaétert tartalmazó szenzorra (**36,38**) meglepő eredményeket kaptunk. Szignálpotenciáljuk a **34**-hez hasonlóan magas érték ($\text{FE} > 100$), így az ammónium sókkal szemben is hasonló viselkedést vártunk. Ezzel szemben esetükben a vendégmolekulák jelenlétében kisebb mértékű, reprodukálható fluoreszcencia intenzitás csökkenés figyelhető meg ($\text{FE} \sim 0,8$). Ez a jelenség a PET-szenzorok körében szokatlan és példa nélküli, ami nem magyarázható másodlagos kölcsönhatásokkal. Figyelembe véve a **34** és **36, 48** szenzorok közti szerkezetbeli különbségeket, felmerült bennünk a gyanú, hogy ebben az esetben a koordináció nem a kumarin oldali gyűrű nitrogénhez történik. Összehasonlítva a benzil-amin és *t*-butoxikarbonilmetil-amin pK_a értékét a kumarilmetil-aminéval arra a megállapításra jutunk, hogy előbbieket bázicitása nagyobb.^{37,43} Ezt az állítást bizonyítandó savval (CF_3COOH) titráltuk a **38** szenzort (25. ábra).



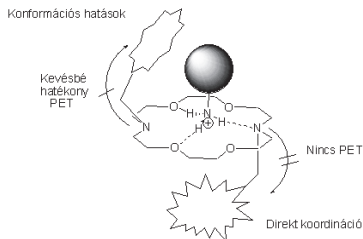
25. ábra. 38 szenzor 2 mmol/dm^3 -es oldatának titrálása CF_3COOH -val kloroformban

A mérés során már igen csekély sav hatására azt tapasztaltuk, hogy a fluorofór csoporttal szemközti CH_2 -jelek változnak meg előbb, vagyis valóban a kumarinnal áttellessen nitrogén pK_a értéke nagyobb, ez protonálódik előbb. Amennyiben a vendégmolekula a **36**, **38** szenzor esetében a bázikusabb nitrogénhez kötődik, úgy nem jön létre másodlagos kölcsönhatás a vendégmolekula és a kumarilmetil-rész nitrogénje között, csak a makrociklus konformációja változik. Ez azt jelenti, hogy a fluorofórral szemközti nitrogén redox tulajdonságainak megváltoztatása saját környezete konformációs szabadságát befolyásolja. Valószínűsítjük, hogy az ellenoldali koordináció a kumarilmetil-nitrogén körül olyan változásokat indukál, amely még hatékonyabb fluoreszcencia kioltást eredményez. A kutatásaink során felismert elméletet, miszerint a vendégmolekula bekötésekor létrejövő konformáció-változás is szerepet játszik a fluoreszcens jel megjelenésében a másodlagos kölcsönhatások mellett újabb eredményekkel támasztottuk alá.

Az e témakörben elért eredményeink alapján megállapítást nyert, hogy a hagyományos, kizárólag a vendégmolekulák hidrogén-donor képességén alapuló elmélettel szemben egy másik mechanizmus is fluoreszcencia változást idézhet elő PET szenzorokban. Ez pedig a komplexálódás következtében kialakuló szerkezetbeli változások eredménye. A két hatás egymásra épülve alakítja ki a megfigyelhető fluoreszcencia változást.

3.5.3. Összefoglalás

Az irodalomban elfogadott elmélet szerint a fluoreszcens jel megjelenését kizárólag a vendégmolekula és a receptor közt létrejövő másodlagos kölcsönhatások váltják ki. Ez az elmélet azonban nem minden esetben ad kielégítő magyarázatot. Kutatásaink igazolták, hogy a PET szenzorban található elektrongazdag részlet mobilitása, ill. annak csökkenése, szintén erősen befolyásolja a fluoreszcencia intenzitását. Előállítottunk szimmetrikus, és aszimmetrikus 1,10-diaza-18-korona-6-éter receptorral rendelkező vegyületeket. Komplexálódási kísérleteket végeztünk különböző méretű, és hidogénhid donor képességű ammóniumsókkal. A fluoreszcens jelerősítések alapján a két fluorofór csoporttal rendelkező szenzor (**34**) jól alkalmazható a vizsgált vendégmolekulákhoz meghatározására. Ez a tény különösen figyelemre méltó az NMR-titrálások alapján meghatározott, a többi vizsgált szenzortól több nagyságrenddel elmaradó kötődési állandó ismeretében. A **34** vegyület esetében az excimerképzés elmaradása, valamint a röntgenszerkezet is a fluorofórok transz térállását támasztják alá. Ebben az esetben a koronaéter mindkét oldala árnyékolt, így a vendégmolekula bekötését konformációváltozásnak kell megelőznie. A másodrendű kölcsönhatások és a konformációváltozából adódó jelerősítés együttes hatása eredményezi a két fluorofóros vegyület (**34**) megnövekedett érzékenységét. Az előállított aszimmetrikusan szubsztituált diazakeronaéterek esetében a koordináció jelerősítő hatása elmarad a fluorofórral ellenoldali kötődés következtében, mely esetben a makrociklus konformációváltozása gyengíti a jelerősítés mértékét. Vizsgálataink során újabb rendszeren bizonyítottuk a direkt koordináció mellett a komplexálódás során bekövetkező konformációs változások jelerősítésre gyakorolt hatását, mely nemcsak erősítő, hanem gyengítő hatású is lehet.



4. Fluoreszcens jelzőmolekulák és jelentőségük

A biomolekulák – például fehérjék, lipidek, szénhidrátok – képalkotó technikákkal történő tanulmányozása fontos szerepet tölt be az élő szervezetekben lejátszódó folyamatok megértésében. A detektálás érzékenysége és felbontása, viszonylag olcsó kivitelezhetősége miatt ezen képalkotó eljárások előszeretettel alkalmaznak fluoreszcens jelzőmolekulákat mind *in vivo*, mind *in vitro* kísérletekben. A morfológiai feltérképezésen kívül ezen technikák lehetővé teszik a sejten belüli folyamatok tér- és időbeli követését is.

A zöld fluoreszcens fehérje (*GFP*, *green fluorescent protein*, Shimomura O., Chalfie M., Tsien R. Y. – Nobel-díj, 2008)⁴⁴ felfedezése és sokrétű felhasználhatósága⁴⁵ megmutatta a fluoreszcencián alapuló szelektív fehérjejelölés előnyeit a hely és a dinamikai tulajdonságok meghatározásban. A genetikailag kódolt csoportoknak ugyanakkor megvannak a saját korlátai. Nem alkalmazhatók a posztranzlációs módosítások mesterséges utánzásakor, vagy a lipidek és más, a genomban nem direkt módon kódolt molekulák tanulmányozásakor. Így a természetben megtalálható (endogén) fluoreszcens jelzővegyületeken (például aromás aminosavak, porfirinszármazékok, nukleinsav-bázisok vagy fluoreszcens fehérjék) kívül szükség van mesterségesen előállított (exogén) festékmolekulák alkalmazására is. A szintetikus jelzőmolekulák közül kiemelkedő jelentőséggel bírnak azon vegyületek, melyek a vörös, távoli vörös, közeli infravörös („Near Infra Red, NIR”) tartományban gerjeszthetők, illetve emittálnak. Ezen vegyületek gerjesztéséhez kisebb energiájú (nagyobb hullámhosszú) fény szükséges, vagyis besugárzásakor kisebb terhelés éri a sejteket, amely fontos szempont biológiai minták sérülésének minimalizálásához. Ráadásul a nagyobb hullámhosszú fény mélyebben képes a szövetekbe hatolni, így a bőr alól, a lágy szövetekből is nyerhetünk információt. Erre a jelenségre orvosi diagnosztikai módszert is fejlesztettek (NIRS), melynek egy fontos felhasználási területe az agy oxigénellátásának követése.⁴⁶ Ugyancsak előnye a kisebb energiájú gerjesztési és emissziós hullámhossznak, hogy az élő szervezetekben található természetes fluorofórokat nem, vagy csak kisebb mértékben gerjeszti, ezáltal csökken a „saját” fluoreszcencia (autofluoreszcencia). Így a fluoreszcens technikákra amúgy is jellemző nagy érzékenység tovább javul, nagyobb jel - zaj arány elérésével.

4.1. A bioortogonális jelölés lehetőségei

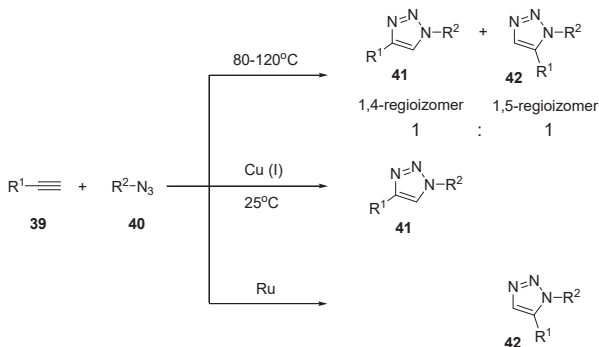
Az exogén fluoreszcens jelzővegyületek bevitelle a vizsgált rendszerbe kétféleképpen történhet: (a) mesterséges szubsztrátok szintézis közbeni vagy poszt-szintetikus jelölésével, illetve (b) a vizsgált természetes vegyületek *in situ* jelölésével. Az utóbbi technika alkalmazásához szükséges a jelzővegyületek ún. **bioortogonális** módon való bevitelle.^{47a} Ez azt jelenti, hogy a biológiai mintát nem károsító, működését nem befolyásoló módon új kémiai funkciót viszünk be a detektálhatóság érdekében. A bioortogonalitás a jelölni kívánt célképleten, valamint a jelölést megvalósító jelzővegyületen levő funkciócsoport-párok között áll fenn. Az ideális esetben szervezetidegen funkciócsoport-párral szemben támasztott követelmény, hogy a vizsgált biológiai rendszerrel szemben inerte legyenek, ne lépjenek mellékreakciókba, illetve toxicitásukkal ne károsítsák azt. Fontos feltétel, hogy a bioortogonális reakciókban alkalmazandó reaktáns-párok egymással gyors, szelektív, fiziológiás körülmények között is nagy hatékonysággal lejátszódó reakcióban stabil kovalens kötést alakítsanak ki. A bioortogonális reakciók ún. klikk-reakciók, amelyek a klikk-reakciókra megfogalmazott feltételeken kívül⁴⁸ a biológiai rendszerekkel szembeni követelményeknek is megfelelnek. Klikk-reakció alatt olyan szelektív és megbízható reakciókat értünk, melyek kisebb építőegységek összekapcsolásával vezetnek a kívánt célvegyületekhez. Ezen reakció segítségével könnyen beépíthetőek a szükséges funkciócsoportok, szerkezeti részletek a szerves vegyületekbe, ezért mára bekerült a szerves kémia eszköztárába.⁴⁹ Mindezek mellett gyakorlati okokból szükséges a megfelelő érzékenység és kimutathatóság elérése, hogy a reakciók gyorsan, legalább a biológiai folyamatok sebességével összemérhetően játszódjanak le alacsony koncentrációtartományban is, illetve hogy a kapott termék detektálható legyen. Ez utóbbi fluoreszcens vegyületek bejuttatásánál adott.

Bár számos kémiai módszer és átalakítás ismeretes, ezek közül csak néhány felel meg a bioortogonalitás szigorú feltételeinek. Ezek az alábbiakban foglalhatóak össze:

- a.) alkinok és azidok közti 1,3-dipoláris cikloaddíció
- b.) alkének és tetrazolok fotoindukált cikloaddíciója
- c.) azidok reakciója foszfinokkal (Staudinger-ligáció)
- d.) a tetrazinokra épülő fordított elektronigényű Diels-Alder reakciók.

4.1.1. Alkinok és azidok közti 1,3-dipoláris cikloaddíció

Először Huisgen figyelte meg 1961-ben az alkinok és azidok között termikus aktiválásra lejártszódó 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakciót, melyben 1,2,3-triazolok statisztikus keveréke képződik (26. ábra)⁵⁰. A szelektivitás hiánya az aktiválási energiák csekély különbségéből adódik, amit elméleti kémiai számítások igazoltak. A viszonylag hosszú reakcióidőt kívánó, 1,4- és 1,5-triazolt eredményező reakció a hőmérséklet emelésével (kb. 100-120°C) gyorsítható. Sharpless és Meldal kutatása jelentett áttörést a reakció gyakorlati felhasználásának szempontjából, mivel megfigyeléseik szerint a reakció szobahőmérsékleten is magas hozammal játszódik le katalitikus mennyiségben jelen levő Cu(I) ionok segítségével.⁵¹ A Cu(I) katalizált 1,3-dipoláris cikloaddíció (CuAAC) kielégíti az ún. klikk-reakciók⁴⁸ követelményeit, azonban a klikk-reakciók köre ennél jóval szélesebb.

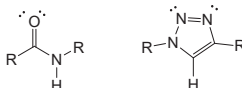


26. ábra. 1,3-dipoláros cikloaddíció termikus, Cu(I), Ru aktiválással

A szükséges alapanyagok egyszerűek és könnyen hozzáférhetőek. Szerves azidokat előállíthatunk alkil⁵², allil⁵³ és benzil⁵⁴ halogenidekből, illetve alkoholok szulfonsav származékából (tozilát⁵⁵, mezilát⁵⁶) nátriumazid segítségével. További megoldás szerves azidok szintézisére oxiránok⁵⁷ és aziridinek⁵⁸ gyűrűfelfnyitása nátriumaziddal, mint nukleofillel. Aromás azidok a megfelelő aromás aminokból⁵⁹, illetve halogenidekből⁶⁰ nyerhetők, de találunk eljárásokat bórsavakból⁶¹ kiinduló szintézisekre is. A terminális alkinrésztel kialakításának gyakori módja szabad hidroxil-⁶² és aminocsoportok⁶³ propargilezése. Alkalmazhatnak hosszabb szénláncú reagenseket, így a funkciócsoport-

bevétel mellett finomhangolható a molekularészletek közötti távolság. Aromás gyűrűk alkinrészlettel való funkcionálisálásának elterjedt és kedvelt módja a Sonogashira-reakció.⁶⁴

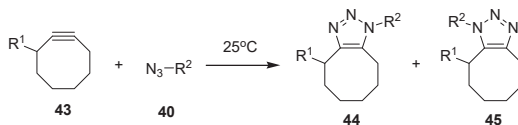
A réz(I) katalizált cikloaddíció kielégíti a már tárgyalt bioortogonalitás feltételeit, ennek megfelelően nem érzékeny vízre, amely akár oldószerként is használható széles pH tartományban (pH~3-10). Az eljárás további előnye, hogy általában szobahőmérsékleten gyorsan lejátsszódik, ami a reakció *in vivo* alkalmazását, például sejtek jelölését is lehetővé teszi. A kialakuló triazolváz kémiaiailag igen ellenálló, savas és lúgos közegben is stabil, valamint utánozza a peptidkötés atomjainak elrendeződését (R-R csoportok közt: peptid~3,9Å; triazol~5Å, 27. ábra).⁶⁵



27. ábra. A peptid-kötés és a triazol-gyűrű hasonlósága

A szubsztrátok változatossága, hozzáférhetősége, valamint az enyhe és egyszerű reakciókörülmények mind az anyagtudományi, mind a gyógyszerészeti kutatások körében elősegítették az azid-alkin kapcsolás elterjedését. Az új gyógyszer-hatóanyagok fejlesztése nagyszámú vegyület szintézisét követeli meg, ennek során egész vegyülettárakat⁶⁶ állítottak elő a hatékony CuAAC reakciót felhasználva. A Cu(I) katalizált folyamat érdekessége, hogy – bár a fluorofórok bevétele szempontjából kevésbé fontos – az eredetileg nem regioszelektív reakció kizárólag az 1,4-szusztituált triazolt (**41**) eredményezi. Megvalósítható az 1,5-regioizomer (**42**) szelektív előállítása is Ru-katalizált reakcióban.⁶⁷

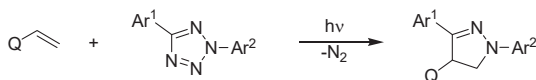
Évekkel később a reakció biológiai szempontból jelentős, Cu(I) katalizist nem igénylő változatát is kifejlesztették, kiküszöbölve ezzel a réz citotoxikus hatását. Ez utóbbi, Bertozzi és munkatársai nevéhez köthető, ciklooktinok és azidok közti reakció. A cikloalkin gyűrűfeszültsége miatti nagy energiatartalomnak (10-19 kcal/mol) köszönhetően nem igényli réz jelenlétét (28. ábra).⁶⁸ A C-C≡C-C egység szerkezete egyenes és merev, csak nagyobb gyűrűtagszámú cikloalkin képes elviselni ezt a geometriát. A legkisebb ilyen stabil és izolálható vegyület a ciklooktin. A reakció előnyei mellett meg kell említenünk hátrányát is, a jelentősen csökkent reakciósebességet. A reakciósebesség növelése érdekében számos ciklooktinszármazékot kifejlesztettek. Ezek reaktivitása napjainkra már megközelíti a CuAAC reakció sebességét, de még mindig 2 nagyságrenddel elmarad attól.⁶⁹



28. ábra. Rézmentes 1,3-dipoláros cikloaddíció

4.1.2. Alkének és tetrazolok fotoindukált cikloaddíciója

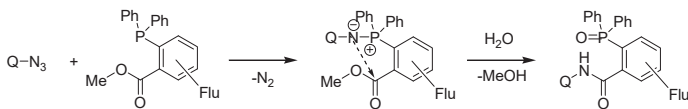
Biomolekulához kapcsolt, alként tartalmazó lánchoz fotokémiai úton szelektíven és gyorsan köthetünk diaril-tetrazol részt tartalmazó molekulákat⁷⁰. A néhány perces UV fény besugárzás hatására kilépő N₂ után képződő nitrilimin reagál az alkénnel 1,3-dipoláris cikloaddícióban (29. ábra), vagyis az aktív specieszt *in-situ* állítjuk elő. Előnye, hogy a kiindulási anyagokkal ellentétben a képződő pirazolin-származék fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkezik (a szubsztituensektől függően 487 - 538 nm közötti emissziós maximumokkal), kvantumhasznosítási tényezője széles határok közt változhat⁷¹ (0,004-0,63).



29. ábra. Alkének és tetrazolok cikloaddíciója

4.1.3. Staudinger-ligáció

A Staudinger-ligációt az azid csoport trifenil-foszfínos redukciója (ún. Staudinger-redukció)⁷² alapján Saxon és Bertozzi dolgozta ki⁷³ 2000-ben. Ehhez olyan foszfinszármazékot alkalmaznak, amelyben az egyik aril-csoporthoz elektrofil csapdát kötünk (pl. észter-csoportot). A reakció során keletkező ilid vizes közegben történő átrendeződése során a nitrogén negatív töltése az elektronhiányos karbonil szénnel lép kölcsönhatásba, majd egy víz belépése és egy alkohol eliminációja során alakul ki a stabil amid és a foszfin-oxid (30. ábra). Preparatív szempontból érdemes az észter csoport és a fluorofór azonos aril csoporton történő bevitele. Irodalmi példák alapján jól alkalmazható pl. nukleozidok⁷⁴ jelölésére. Előnye, hogy a reagensek és az elimináló molekulák (alkohol, N₂) is biokompatibilisek, a reakció hajtóereje a spontán foszfin-oxid keletkezése. Hátránya a viszonylag alacsony reakciósebesség és a kiindulási foszfinszármazék spontán oxidációja.

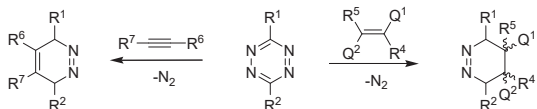


Flu: fluoreszcens csoport

30. ábra. Staudinger-ligáció mechanizmusa

4.1.4. Fordított elektronigényű Diels-Alder reakció

Az elsőként Hantzsch és Lehmann által előállított 1,2,4,5-tetrazin⁷⁵, vagy más néven s-tetrazin, a 3 lehetséges alapváz közül az egyetlen, amelyik stabil. Aromás stabilizációjának energiáját *ab initio* és szemiempírikus számításokkal is meghatározták: a stabilizáció kisebb, mint a kevesebb nitrogént tartalmazó hattagú rendszerekben.⁷⁶ Emiatt relatíve nagy reakciókészséget várhatunk az elektronhiányos gyűrűtől. A gyakorlatban ez a diénekhez hasonló cikloaddíciós képességükben valósul meg. Carboni és Lindsey 1959-ben számolt be⁷⁷ az aromás fluoroalkil-tetrazinok és alkinek, illetve egyszerű olefinek közti [4+2]-es cikloaddíciós reakciókról, a lehetséges mechanizmust pedig Sauer és munkatársai javasolták, és bizonyították is⁷⁸ (31. ábra). Tőlük ered a fordított elektronigényű Diels-Alder-reakció elnevezés.



31. ábra. Fordított elektronigényű Diels-Alder reakció mechanizmusa

A mechanizmusát tekintve elsőként egy biciklusos intermedier képződik, majd gyors nitrogénvesztés közben piridazinná vagy 1,2-dihidro-piridazinná alakul. Utóbbi gyakran spontán piridazinná oxidálódik. A fordított elektronigényű Diels-Alder reakció szintén alkalmas bioortogonális jelölésre⁷⁹: megfelelően nagy (transz-ciklookténnel, mint reakciópartnerrel), reakciókészsége hangolható a gyűrű elektronhiányosságának módosításával. Az R^1 , R^2 szubsztituensekkel befolyásolni tudjuk a tetrazin gyűrű elektronsűrűségét. Fluoreszcens csoportok bevitelére két módszer létezik: vagy a tetrazingyűrűhöz kapcsoljuk a fluorofórt és a telítetlen ligandumot pedig a biomolekulához, illetve fordítva.

4.2. Célkritériumok

Áttekintve a bioortogonális jelölésre alkalmas reakciótípusokat megállapíthatjuk, hogy a réz(I) által katalizált 1,3-dipoláris cikloaddició különösen alkalmas módszer ennek megvalósítására, melynek számos oka van. A reakció egyszerű, gyors, robosztus, keresztreakcióktól mentes. A kiindulási anyagok könnyen és olcsón hozzáférhetőek, diverzek. A reakció nem érzékeny sem vízre, sem oxigénre, a körülmények enyhék és széles határok között változhatnak. A szintetikus jelzővegyületek széles palettájáról kiemelkedő jelentőséggel bírnak azon vegyületek, melyek a vörös, távoli vörös, közeli infravörös („near infra red, NIR”) tartományban gerjeszthetők, illetve emittálnak. Azok a vegyületek, amelyek gerjesztési és emissziós hullámhosszai közti különbség (Stokes-eltolódás) kiemelkedően nagy, további alkalmazásokban is felhasználást nyerhetnek. A felsorolt előnyök ellenére kevés klikk-reakcióba vihető festékvegyület létezik, mely a spektrum VIS-NIR tartományában használható. Munkánk során ezért biológiai minták jelölésére alkalmas távoli vörös, NIR tartományban emittáló „klikk-fluorofórok” előállítását és vizsgálatát terveztük.

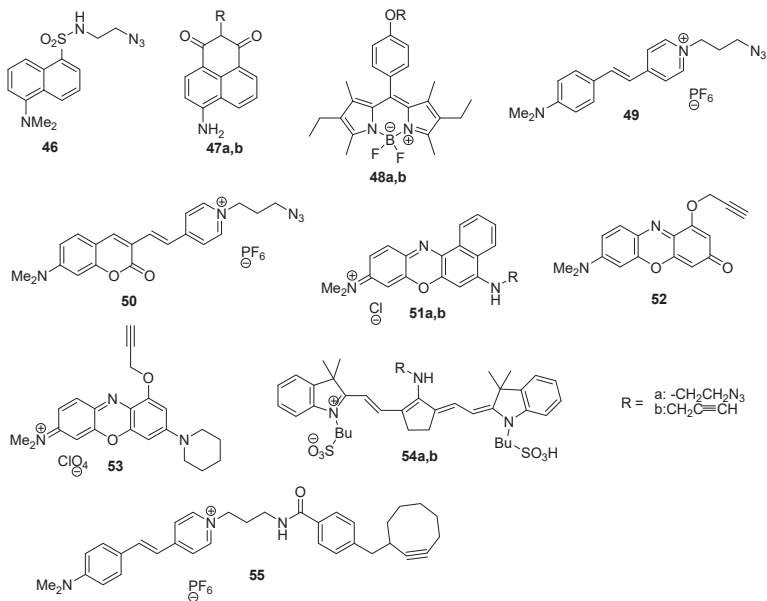
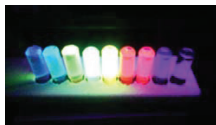
4.3. Saját eredmények – Fluoreszcens jelzőmolekulák (előzmények)

A biomolekulák képalkotó technikákkal történő tanulmányozása fontos szerepet tölt be az élő szervezetekben lejátszódó folyamatok megértésében. A detektálás érzékenysége, és felbontása, alacsony ára miatt ezen képalkotó módszerek előszeretettel alkalmaznak fluoreszcens jelzővegyületeket, akár *in vivo*, akár *in vitro* kísérletekben. Ezen technikák lehetővé teszik a sejten belüli folyamatok tér- és időbeli követését. A természetes fluoreszcens jelzővegyületeken, (például aromás aminosavak, porfirinszármazékok, nukleinsav-bázisok vagy fluoreszcens fehérjék) kívül szükség van szintetikusan előállított jelzővegyületek alkalmazására is. A jelzővegyületet a bioortogonalitás elvének megfelelően kell bejuttatni a biológiai mintába. Ennek megfelelően a jelzés nem befolyásolhatja az élő rendszer működését, nem léphet vele előre nem tervezett reakcióba.^{47a} Csak néhány, az irodalmi bevezetőben említett, reakciótípus alkalmas jelzés bevitelére, mi ezek közül a réz(I) katalizált 1,3-dipoláris cikloaddíciót (CuAAC) választottuk, azonban feszített gyűrűs (pl. ciklooktín) alkinek alkalmazásával az átmenetifém katalizátor is mellőzhető. A módszer egyszerű, gyors, hatékony, az élő szervezetekből hiányzó alkin és azid funkciónak köszönhetően mellékreakcióra nincs lehetőség. Biológiai minták jelölésére a távoli vörös-NIR tartományban emittáló fluorofórok hatékonyabbak, kevésbé terhelik a mintát, valamint a fluoreszcens képalkotótechnikáknál alkalmazott lézerekkel (Ar: $\lambda = 515$ nm, He-Ne_{zöld} : $\lambda = 543$ nm, He-Ne_{vörös} : $\lambda = 633$ nm) általában jól gerjeszthetőek. Ebben a hullámhossz-tartományban ráadásul a vizsgált biológiai képletek mélyebb rétegekben is vizsgálhatók. Mindezek ellenére kevés klikk-reakcióba vihető fluorofór létezik, ami a látható-közel infravörös hullámhossztartományban emittál. Egy korábbi munkánkban olyan fluorofórok előállítását valósítottuk meg, amelyek emissziós hullámhosszával a teljes látható spektrum (7.táblázat; 32. ábra) lefedhető egészen a közeli infravörös tartományig⁸⁰.

	46	47	48	49	50	51	52	53	54
$\lambda_{\text{max(abs)}}$	330	450	520	480	505	625	550	651	664
$\lambda_{\text{max(em)}}$	460	540	535	600	630	675	620	673	718
ϵ^a	0.34	0.68	6.3	4.7	5.7	1.8	7.0	7.3	10.0

7. táblázat. Klikk-reakcióba vihető fluorofórok fotofizikai tulajdonságai metanolban

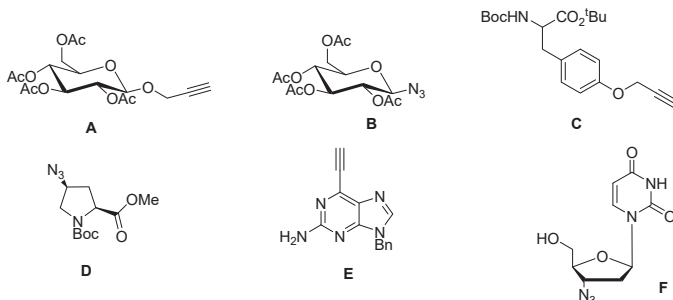
$$(^a \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$



32. ábra. A teljes spektrumot lefedő, klikk-reakcióba vihető fluorofórok

A CuAAC-reakcióhoz szükséges azid, és alkin funkciót a megfelelő haloalkin- és propargilamin származékokon keresztül építettük be.

Új festékeink alkalmazhatóságát különböző biológiai építőkövek (cukrok, aminosavak, nukleotidok, **A-F**, 33. ábra) azid, vagy alkin csoporttal módosított származékain teszteltük. A termékeket általánosan jó, néha kiváló izolált termelésekkel (75-98%) kaptuk, ami alátámasztja a CuAAC reakció hatékonyságát.



33. ábra. Azid és alkin funkcióval módosított biológiai építőkövek

E munka során előállítottunk olyan fluoreszcens vegyületet is, mely ciklooktin funkciós csoportot (**55**) tartalmazott. Ez utóbbi vegyület így rézmentes körülmények között is képes azidokkal való reakcióra. Az új, előállított vegyületek alkalmazhatóságát sejtek festésében is sikerrel teszteltük.

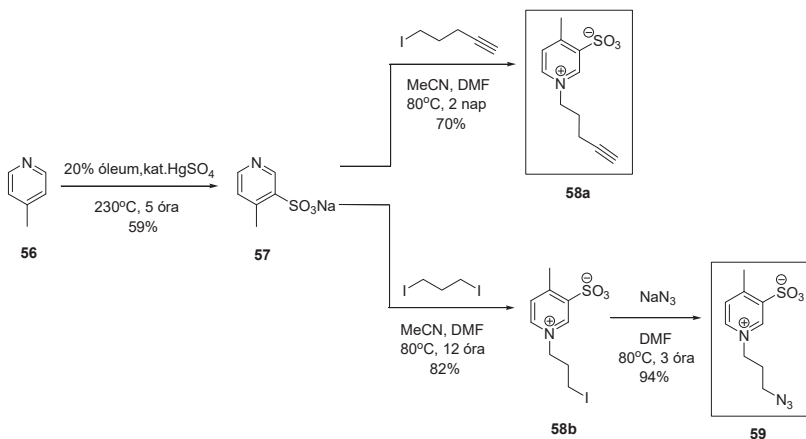
4.3.1. A „klikk”-reakcióba vihető NIR festékek előállítása

A fluoreszcens jelzővegyületek jellemző tulajdonsága a kvantumhasznosítási tényező, fluoreszcens élettido, gerjesztési és emissziós hullámhossz. Ez utóbbi két tulajdonság közti különbséget nevezzük Stokes-eltolódásnak. A Czerney és munkatársai által 'mega-Stokes' festékeknek⁸¹ nevezett vegyületek Stokes-eltolódása általában nagyobb, mint 100 nm. A nagy hullámhossz-különbségnek köszönhetően a gerjesztési és emissziós spektrumok tökéletesen elkülönülnek, így alkalmazásukkor csökken az önabszorpció mértéke. Az e típusba tartozó jelzővegyületek különösen alkalmasak energiatranszfer rendszerekben történő alkalmazásokban. Munkánk során célul tűztük ki olyan klikk-reakcióba vihető mega-stokes típusú jelzővegyületek előállítását, melyek emissziós maximuma a távoli vörös, közeli IR tartományba esik.

Az irodalmi hivatkozások^{81,82} és saját tapasztalataink alapján⁸⁰ polimetin struktúrájú, kiterjedt delokalizációval rendelkező, könnyen és kis költséggel előállítható, bioortogonális (CuAAC) reakcióba vihető fluoreszcens jelzővegyületeket terveztünk, melyek várhatóan a spektrum távoli vörös vagy NIR tartományában emittálnak.

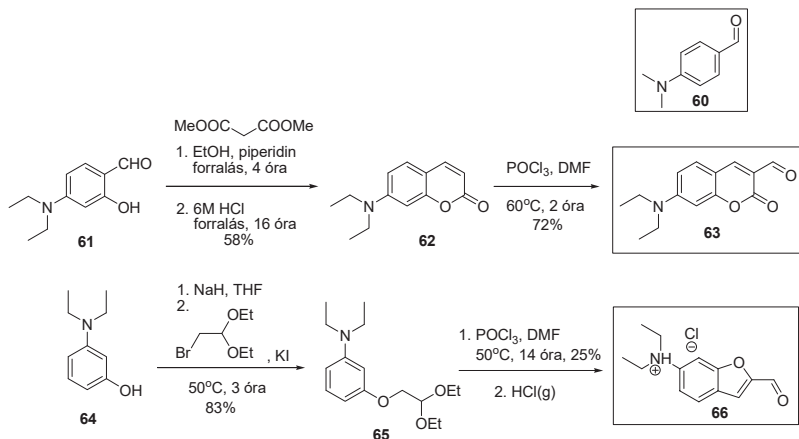
A fluorofórok kulcsfontosságú eleme a pikolinból levezethető modul. Ennek konjugálása a fluoreszcens alapvázakhoz segíti elő a gerjesztési és emissziós maximumoknak

a vörös tartomány felé való tolódását. Ugyancsak kulcsfontosságú a pikolinium rész abból a szempontból, hogy ezen a szerkezeti elemen található a vízdékonyság elősegítéséért felelős szulfonil csoport, illetve a biokonjugációért felelős alkin, vagy azid csoport. A szintézisek első lépéseként (34. ábra) a γ -pikolint (**56**) 20%-os óleummal szulfonáltuk, így jó termeléssel jutottunk a pikolin-szulfonsav nátrium sójához (**57**). Ezt 5-jód-1-pentinnel reagáltatva kaptuk az alkin szubsztituált fluorofórok prekursorát (**58a**). A (**57**) szulfonsav-Na-sóját 1,3-dijód-propánnal alkilezve, a **58b** köztiterméket kaptuk, melynek halogenidjét azidra cserélve jutottunk az azid szubsztituált festékek prekursorához (**59**).



34. ábra. Az azid és alkin szubsztituált festékekprekursorok előállítása

A azid- és alkin-prekursorokhoz kapcsolandó karbaldehideket vagy a kereskedelmi forgalomból szereztük be (**60**), vagy irodalmi analógiák^{83, 84} alapján állítottuk elő (**63,66**) (35. ábra). A **63**-as vegyület előállításához 4-dietilamino-szalicilaldehidből (**61**) indultunk ki. Knoevenagel-kondenzációs reakcióban alakítottuk ki a kumarin vázat, majd decarboxilezési lépésen keresztül jutottunk a 7-dietilamino-kumarinhoz (**62**). Ezt Vilsmeier-Haack-formilezési reakcióba vittük, így kaptuk a kumarin vázas karbaldehidet (**63**). A benzofurán-származék (**66**) előállításához 3-dietilaminofenolt (**64**) brómacetaldhid-dietilacetállal reagáltattuk. A kapott **65** köztitermék a formilezés körülményei között gyűrűt zárt, és a kívánt karbaldehidet eredményezte. Ezt HCl gáz segítségével sóvá (**66**) alakítottuk a könnyebb kezelhetőség érdekében.



35. ábra. A festékekhez szükséges karbaldehidek előállítása

Az előállított pikolin-származékokat (58a,59) és karbaldehideket (60,63,66) kondenzáltatva enyhe körülmények között jutottunk az azid- és alkin funkciójú polimetin bázisú fluorofór festékekhez általában jó / elfogadható termeléssel (8. táblázat).

$\text{Pikolin-származék} + \text{R}^2\text{CHO} \xrightarrow[60^\circ\text{C}, 16 \text{ óra}]{\text{EtOH, piperidin (kat.)}} \text{Kondenzált termék}$			
	67a 77%	68a 90%	69a 20%
	67b 56%	68b 36%	69b 28%

8. táblázat. Klick-reakcióba vihető Mega-Stokes fluorofórok kitermelése értékei

4.3.2. A festékek fluoreszcens tulajdonságai

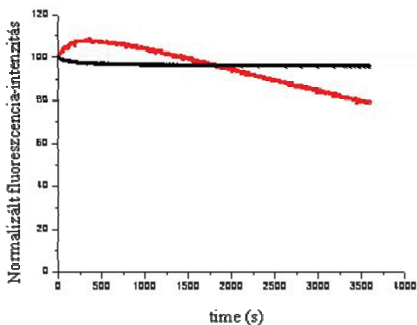
Mind metanolban, mind fiziológiás kémhatású (pH=7,4) foszfát-pufferben (PBS) megvizsgáltuk a festékek fluoreszcens tulajdonságait (9. táblázat). Az utóbbi oldószer a biológiai alkalmazhatóság miatt volt érdekes. Mindegyik festék gerjesztési és emissziós maximuma igen távol esik egymástól, a Stokes-shift értékek minden esetben meghaladták a 100 nm-t. Várározásainknak megfelelően az emissziós hullámhosszak a spektrum távoli vörös-közel IR régiójába esnek. Mindhárom fluoreszcens váz esetében elmondható, hogy foszfát-pufferben a hullámhossz-maximumok kissé vöröseltoztak a metanolhoz képest, ami a puffer polárisabb karakterével magyarázható.

Festék	Oldószer	λ_{max} (gerj) [nm]	λ_{max} (em) [nm]	$\varepsilon (\times 10^4)$ [M ⁻¹ *cm ⁻¹]	Φ^a
67	MeOH	519	625	5,6	0,8
	PBS	523	630	4,3	-
68	MeOH	538	674 (695)	4,8	15,7
	PBS	544	675 (697)	5,3	1,0
69	MeOH	586	735	4,0	1,0
	PBS	588	744	2,8	-

9. táblázat. Mega-Stokes fluorofórok fotofizikai tulajdonságai

[a]: kretil-ibolya referenciát használtunk, $\Phi_F^0 = 0,545$ MeOH-ban⁸⁵

Elfogadható kvantumhasznosítási tényező, és kiváló fotostabilitás jellemzi az összes festéket. Egy óra folyamatos besugárzás hatására az **68** vegyület 4%-ot, míg a **69** festék 21%-ot veszített kezdeti emissziós intenzitásából (36. ábra), vagyis igen ellenállóak a fotodegradációval szemben. (A **67** vegyület fluoreszcencia intenzitása a folyamatos besugárzás hatására folyamatosan nőtt. E jelenség értelmezéséhez további kísérletek szükségesek). A kvantumhasznosítási tényezők meghatározását németországi együttműködő partnereink végezték (Daniela Achatz, Otto Wolfbeis, Regensburg).



36. ábra. 68 (fekete), 69 (piros) fluorofórok fotostabilitása

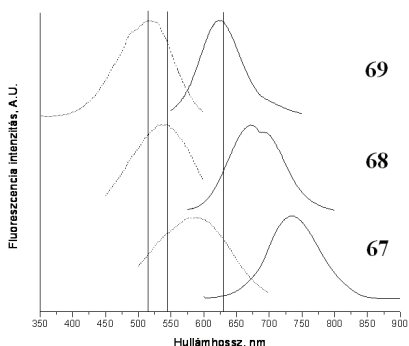
Kutatócsoportunkban korábban előállítottuk az **67b** vegyület szulfonyl-csoport nélküli analógját (**50**). Összehasonlítva a két vegyület spektrális tulajdonságait megállapíthatjuk, hogy a szulfonyl-csoport bevezetése a gerjesztési és az emissziós maximumok vörös irányba való eltolódását eredményezte, viszont várakozásainkkal ellentétben a vízőldhatóságot nem befolyásolta jelentősen (10. táblázat).

Festék	λ_{max} (gerj) [nm]	λ_{max} (em) [nm]
53	480	600
71b	519	625

10. táblázat. Szulfonyl-csoport hatása gerjesztési és emissziós maximumokra

Az új festékek kimagasló Stokes-shiftje mellett érdemes megjegyeznünk, hogy gerjesztésük megvalósítható a fluoreszcens képalkotó technikákban használt lézerek segítségével (Ar: $\lambda = 515$ nm, He-Ne_{zöld} : $\lambda = 543$ nm, He-Ne_{vörös} : $\lambda = 633$ nm). A várakozásoknak megfelelően az azonos vázzal rendelkező jelzővegyületek **a** (alkin) és **b** (azid) sorozatainak fotofizikai tulajdonságai azonosnak bizonyultak. A festékek kimagasló Stokes-shiftje (37. ábra) alkalmassá teszi őket energia transzfer rendszerekben (FRET) való felhasználásra. Az ilyen típusú rendszerekben két spektrálisan összehangolt fluorofór található. Az ún. energiadonor gerjesztési hullámhosszán történő gerjesztést követően annak gerjesztési energiája átadódik az energiaakceptor fluorofórra, így megjelenik annak emissziós szinképe is. A FRET folyamat hatékonysága a fluorofórok térbeli közelségének függvénye

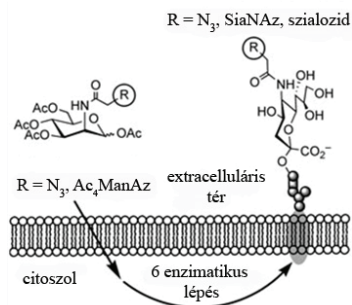
(max 100 Å-ig), így előszeretettel alkalmazzák ezen technikát enzimkinetikai mérésekre, konformációváltozások követésére, vagy mikroszkópok felbontásának javítására. Az általánosan alkalmazott fluorofórok használatakor felmerül a probléma, hogy a két csatolt rendszer gerjesztési sávja nem válik szét tökéletesen, és ekkor a besugárzó fény direkt kölcsönhatásba lép az akceptor rendszerrel. A kimagaslóan nagy Stokes-shifttel rendelkező festékek alkalmazásával e probléma kiküszöbölhető.



37. ábra. 67,68,69 festékek gerjesztési (szürke) és emissziós (fekete) spektruma metanolban (függőleges vonallal jelölve a lézerek hullámhosszát)

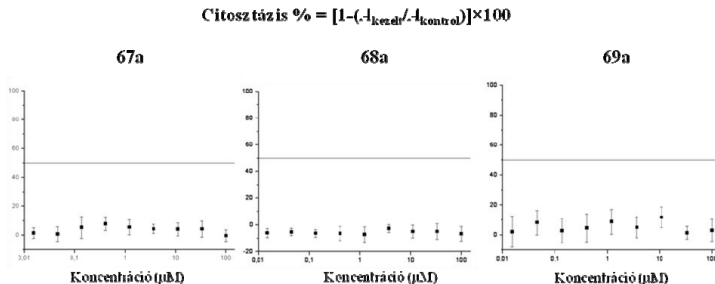
4.3.3. A festékek alkalmazhatósága

Az új, nagy Stokes-eltolódással rendelkező vegyületeket sejtfestésben kívántuk tesztelni. Modellrendszerként kínai hörcsög petefészkek sejtjeit (Chinese hamster ovary – CHO-sejtek) alkalmaztuk. A CHO-sejtek jellegzetessége, hogy sejtfelszínük gazdag glikoproteinekben, melyek szialinsavat tartalmaznak. A jelölés előtt a sejteket azidoacetil-mannózamint (ManNAz) tartalmazó táptalajon tartottuk 3 napig.⁸⁶ Ez idő alatt a sejtek anyagcseréjük révén felvették a módosított cukrot, majd beépítették azt a sejtfelszíni glikoproteinekbe (38. ábra). Az azid funkció bevitele után az alkin funkcióval ellátott (a festékek **a** jelű verziója) festékeket próbáltuk ki egy jelölésre általánosan alkalmazott rendszerben⁸⁶: Cu(II), nátrium-aszkorbát, trisz(benziltriaolilmetil)-amin(TBTA). A TBTA a Cu(I) komplexálásával véd az oxidáció ellen, és oldatban tartja a fém katalizátort. A sejtjelöléseket és a citosztatikus hatásvizsgálatokat együttműködő partnereink, Orbán Erika és Bösze Szilvia végezte el az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjából.



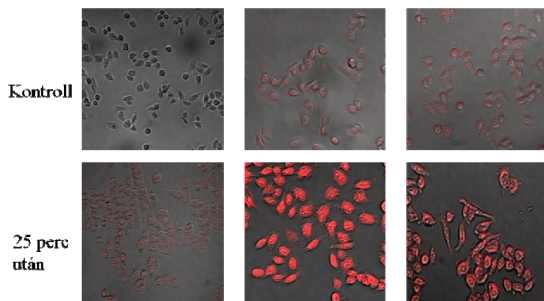
38. ábra. *Azidoacetil-mannózamin beépülése a sejt felszíni glikoproteinekbe*

A biológiai alkalmazásokban kiemelkedő jelentőséggel bír, hogy az alkalmazott fluoreszcens jelzővegyület milyen biológiai hatással rendelkezik. Ennek kiderítése céljából megvizsgáljuk az előállított, új festékek **67a-69a** citosztatikus hatását. Az eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált 100 mM-os koncentrációig a fluoreszcens jelzővegyületek egyike sem gátolta a sejtek szaporodóképességét. (39. ábra)



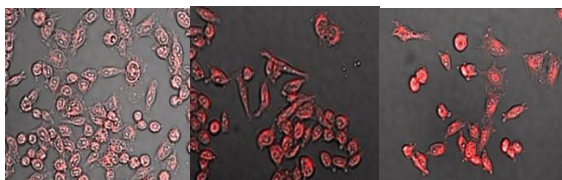
39. ábra. *Citosztatikus hatás vizsgálata 67a-69a festékekre*

Az azid funkcióval módosított cukor sejt felszíni beépülése után a sejteket -20°C -on 10 perc alatt metanolban fixáltuk, majd a fixált sejteket jelöltük az alkin funkciócsoportot tartalmazó jelzővegyületeinkkel. A sejt festést CuSO_4 /nátrium-aszorbát/TBTA rendszer segítségével foszfát pufferben ($\text{pH}=7,0$), 37°C -on az alkin funkcióval ellátott **67a-69a** festékeket $20 \mu\text{M}$ koncentrációban alkalmazva végeztük.



40. ábra. *Fixált CHO-sejtek jelölése 67a-69a festékekkel PBS pufferben*

A konfokális mikroszkópos felvételek (40. ábra) azt mutatták, hogy a sejtfestés már 25 perc alatt eredményes. A fluoreszcens jel eltérő intenzitását valószínűleg a festékek eltérő kvantumhasznosítási tényezője okozza. A kontroll sejtek sejtfelszíne nem tartalmaz azid funkciót, így az ebben az esetben megfigyelhető gyenge fluoreszcencia a festékek nem-specifikus kötődésének köszönhetőek. A jelölési reakció sebességének követése érdekében, az egyik festék, a benzofurán részletet tartalmazó **69a** esetében a folyamat időfüggését is vizsgáltuk (41. ábra).



41. ábra. *Fixált CHO-sejtek jelölésének időfüggése 69a festékekkel (5, 25, 60 perces felvételek)*

A mikroszkópos felvételeken már 5 perc elteltével jól láthatóvá váltak a glikoprotein struktúrák, az idő előrehaladtával a jelölés intenzitása pedig tovább erősödött.

4.4. Összefoglalás

Biológiai minták jelölésére igen alkalmas módszer a Cu(I) katalizált 1,3-dipoláris cikloaddíció, (CuAAC) – ún. klikk-reakció - mivel segítségével sikerrel valósítható meg biológiai minták jelölése. A szintetikus jelzővegyületek közül kiemelkedő jelentőséggel bírnak a NIR, Mega-Stokes vegyületek. Az irodalomban ez idáig kevés klikk-reakcióba vihető festékvegyület teljesíti ezeket a feltételeket. Ezt a hiányt pótolandó állítottuk elő azid és alkin funkcióval ellátott, egyszerű szerkezetű festékmolekuláinkat könnyen és olcsón hozzáférhető, jól variálható alapvázak – úgy, mint kumarin és benzofurán – felhasználásával. A polimetin szerkezetű festékek teljesítették elvárásainkat: a spektrum távoli vörös-NIR tartományában emittálnak, valamint igen nagy Stokes-shifttel rendelkeznek, amely tulajdonság energiatranszfer alkalmazásokban nyerhet felhasználást. A festékek gerjesztése megoldható a fluoreszcens technikákban alkalmazott lézerek segítségével, fotostabilitásuk kiváló. A fotofizikai vizsgálatokon túl, sejtjelölésben való alkalmazhatóságát is sikerrel teszteltük. Ennek első lépéseként megállapítottuk, hogy nagy koncentrációban sem gátolják a sejtosztódást. CHO-sejtek azid funkcióval módosított sejtfelszíni glikoproteinjeit alkin funkciót hordozó festékeink segítségével jelöltük meg. A klikk-reakció gyorsan és fiziológias körülmények között kvantitatív végbement, a sejtek jól láthatóvá váltak konfokális fluoreszcens mikroszkóp számára. A jelölés időfüggését is vizsgáltuk a benzofurán vázas jelzőmolekulát (**69**) használva. A sejtfelszíni struktúrák már öt perc elteltével jól kivehetőek a mikroszkópos felvételeken. Vegyületeink jelentőségét jól jelzi, hogy azok kereskedelmi forgalomban is kaphatóak.

5. Összefoglalás

A dolgozatban bemutatott két tudományterület a fluoreszcens technikák hihetetlen érzékenységet használják ki, amelynek segítségével akár egyetlen molekula is kimutatható, vagy akár láthatóvá tehető. A detektálás olcsó, és egyszerű, kiváló tér- és időbeli felbontás jellemzi, ennek köszönhető, hogy rengeteg alkalmazás használja ki előnyös tulajdonságait.

Az egyik ilyen felhasználás egy adott vendégmolekulára specifikus fluoreszcens szenzorvegyületekkel történő koncentráció-meghatározás. Ahhoz, hogy képesek legyünk akár egy bonyolult biológiai mátrixból is a vendégmolekulát szelektíven komplexálni szenzoraink segítségével, szükséges a szenzor – vendégmolekula (host – guest) kölcsönhatás minél részletesebb ismerete. Ez a törekvés sarkallt bennünket, amikor az irodalomban elfogadott elmélet már nem nyújtott kielégítő magyarázatot a komplexálás során tapasztalt jelenségekre. Megfigyeléseink szerint a másodrendű kölcsönhatások mellett a konformációváltozás fluoreszcenciaerősítésre gyakorolt szerepének pontos ismerete szükséges a szenzorfejlesztéséhez.

A fluoreszcencia módszerét használjuk ki akkor is, amikor élő, vagy élettelen szervezetet, vagy struktúrát jelölünk meg, és teszünk láthatóvá fluoreszcens festékek segítségével. Alapvető elvárás ezzel a módszerrel szemben, hogy a bevitt új molekula ne zavarja meg a célképlet működését, és ne lépjen nem kívánatos keresztreakciókba. Ezen cél érdekében szükséges a fluoreszcens festékek tárházát bővíteni, hogy segítségükkel a spektrum bármely részét lefedjük, fotofizikai tulajdonságaikat kihasználjuk. Az élő szervezetben követve a jelölt funkciót, szerkezet – hatás összefüggéseket derítsünk fel.

6. Summary

This PhD thesis summarizes the results of our research conducted in two separate fields of science that are connected by the fluorescence phenomenon.

The first part consists of our mechanistic studies on photoinduced electron transfer (PET) sensors, where we studied the possibility of constructing a new mechanism model, which could offer explanation for signal evolution in cases where the classical theory fails. Our studies directed at comparing the fluorescent signal generation in different diazacrown-based sensors revealed that the changes in the conformational mobility of these sensors induced by guest binding have a profound effect on their signaling. We demonstrated that the diazacrown ether based sensor with two coumarin fluorophore units gives an increased fluorescent signal on alkylammonium ion complexation in comparison with the appropriate monoazacrown ether based sensor. Surprisingly, studying the other two similar sensor molecules we observed signal weakening on sensing, a behavior quite unique so far. The origin of the altered signaling (i.e., increase in some cases and decrease in others) was linked to the changes in the sensors' conformational dynamics on complexation. Moreover, these results confirmed that effects derived from conformational dynamics are present in sensors of very simple design and are not a peculiarity coupled with complex frameworks.

The second part of the thesis is about the synthesis of a set of clickable fluorophores that were proved to be suitable for fluorescent labeling of cells. The synthetic routine we have developed provides efficient and easy access to these dyes. The tagging molecules possess acceptable quantum yields and spectral maxima situated in the far-red, NIR regime of the electromagnetic spectrum. This spectral regime is highly desirable for the labeling of biological matter. The easy access to these dyes justifies them to be expected to draw much interest in a large variety of applications in chemoselective and (bio)orthogonal labeling schemes of proteins, sugars, lipids, nucleic acids, or organelles both in vivo and in vitro.

7. Kísérleti rész

Általános munkamenet:

Minden kiindulási anyag, amennyiben nincs külön jelezve kereskedelembe kapható (Aldrich, Fisher, Merck) és további tisztítás nélkül került felhasználásra. Az inert körülmények között alkalmazott oldószereket felhasználás előtt vízmentesítettük, THF esetén káliumot, acetonitril esetén pedig kálium-hidroxidot használtunk, majd argonnal öblítettük át. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokat a Macherey-Nagel + Co. által gyártott Polygram SIL G/ UV 254 0.25 mm szilikagél VRK lapokon végeztük. Az anyagok megjelenítését 254 és 366 nm-en UV lámpa alatt végeztük. Az oszlopkromatográfiás elválasztást a Merck által gyártott (0.040 – 0.063 mm) szemcseméretű Flash szilikagélen végeztük. Az olvadáspontokat fűthető tárgyasztalú Büchi mikroszkópikus olvadáspontmérő készüléken, illetve Büchi-B540 kapillárisos olvadáspontmérő készüléken végeztük. Az eredményeket három párhuzamos mérés átlagaként adtuk meg. Az ^1H és ^{13}C NMR spektrumokat Bruker DRX-250, valamint Varian VNMRs 400 spektrométeren vettük fel oldószerként CDCl_3 -ot vagy d_6 -DMSO-t használva. A kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben adtuk meg belső standardként az oldószerek jeleit felhasználva: CDCl_3 (^1H δ 7.26 ppm, ^{13}C δ 77.00 ppm); DMSO (^1H δ 2.50 ppm, ^{13}C δ 39.43 ppm); CD_3OD (^1H δ 5.84 ppm, ^{13}C δ 49.05 ppm). A kapcsolási állandókat (J) Hertz-ben (Hz) adtuk meg. A felhasadások jelölésére a következőket alkalmaztuk: s (szingulet), d (dublett), t (triplett), m (multiplett), br s (széles szingulet), dd (dublett dublett), q (kvartett), quint (kvintett). Gázkromatográfiás vizsgálatokat Chrompack CP9001 gázkromatográfon (10 m x 0.25 mm oszlop 0.12 μm CP-SIL 5CB réteggel, H_2 vivőgáz) készüléken végeztük. GC/MS vizsgálatokhoz Hewlett-Packard 5790A gázkromatográfot (30 m x 0.25 mm oszlop 0.25 μm RH-5 MS+ bevonattal, He vivőgáz) és VG 12-250 tömegspektrométert (Ionforrás: EI+, 70eV, 250°C; interface: 250°C) alkalmaztunk. Az infravörös spektrumokat Bruker IFS-55 FTIR spektrométeren vettük fel gyémánfejes ATR-egység segítségével. Az elemanalitikai meghatározást az ELTE Szervetlen és Analitikai Tanszékének mikroanalitikai laboratóriumában végezték, míg a nagyfelbontású tömegspektrometriás méréseket az EKOL laboratóriumában. A **25** szenzor röntgendiffrakciós vizsgálatát a Debreceni Egyetemen Dr. Bényei Attila végezte.

Fluoreszcenciás mérések:

A méréseket Hitachi F-4500 spektrofluoriméteren 1 cm oldalhosszúságú fluoreszcenciás kvarcküvetát használva végeztem. Sugárforrásként Xe-lámpát használtam állandó belépő és kilépő résszélesség (5nm) mellett a fotoelektronsokszorozó feszültségét 700V-on tartva. A fluoreszcencia erősítés (FE) értékeket három párhuzamos mérés átlagaként adtuk meg. A protonálódási kísérletekben 10^{-6} mol/dm³-es szenzor- és 10^{-3} mol/dm³-es HBF₄-koncentrációt alkalmaztunk acetonitril oldószerben, míg a komplexálódási kísérletek során 10^{-6} mol/dm³-es szenzor- és 10^{-4} mol/dm³-es ammóniumperklorát-koncentráció mellett határoztuk meg az FE értékeket 1%-os metanol tartalmú diklórmétánban. A feltüntetett FE értékek minimum három párhuzamos mérésből származnak.

NMR-titrálások:

Az NMR-titrálásokat Béni Szabolcs végezte el a Semmelweis Egyetemen Varian VNMRs 600 spektrométeren együttműködés keretében. A Job-plot meghatározásakor a szenzor-vendégmolekula összkoncentrációját állandó, 1mM koncentráció értéken tartottuk. A komplex stabilitás meghatározásokhoz végzett titrálások során a 0,5 mM koncentrációjú szenzoroldatokat titráltunk 3,8 mM koncentrációjú vendégmolekula oldatokkal (CH₂Cl₂/CDCl₃/CD₃OD 90/9/1 *V/V/V*%, 25°C). Az oldószerkeleget CDCl₃ oldószerre rögzítettük a spektrumokat, míg a CH₂Cl₂ jelét elnyomtuk megfelelő szelektív pulzussal. Mind a receptor, mind a vendégmolekula megfigyelt kémiai eltolódását a többszörös nemlineáris regresszió elvét alkalmazó OPIUM számítógépes programmal⁸⁷ analizáltuk, segítségével állapítottuk meg a stabilitási állandókat is.

Sejt-jelölések:

Az általunk készített jelzőmolekulák sejtfestésre való alkalmazhatóságát Orbán Erika és Bösze Szilvia végezte el az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjában együttműködés keretében. Modellrendszerként kínai hörcsög petefészek-sejteket (Chinese Hamster Ovary, CHO-sejtek) alkalmaztuk, melynek sejtfelszíne igen gazdag glikoproteinben. Egy általánosan alkalmazott eljárást követve⁶⁸ azid funkciós csoporttal módosított mannózzal kezelt táptalajon inkubáltuk ezeket a sejteket 3 napig, amelyek anyagcseréjük révén felvették, és beépítették a cukorszármazékokat. Ennek következményeként azid-csoporttal módosított szíálsav jelent meg

a sejtfelszínen. Metanol segítségével 10 perc alatt -20°C-on fixáltuk a sejteket, majd még 1 percig acetonnal. Ezek után hajtottuk végre az alkin funkciót hordozó festékek 20 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ -es koncentrációjú oldatával a klikk-reakciót. Katalizátorként a CuSO_4 /nátrium-aszkorbát/TBTA(trisz(benziltriazolilmetil)amin) rendszert alkalmaztuk, amiben a Cu(I) -ionok in situ keletkeznek a nátrium-aszkorbát hatására, a TBTA szerepe pedig a Cu(I) -ionok komplexálása, oldatban tartása ezáltal csökkenthető a bevitt citotoxikus réz mennyisége.

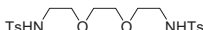
7.1. Reprodukciós kísérletek

Az itt bemutatott vegyületek előállítását az irodalomban leírtak szerint végeztük és a termékeket az ^1H és ^{13}C NMR spektrumok alapján azonosítottuk.



1,2-bisz(2-jódetoxi)etán⁸⁸:

10,0 g (53 mmol) 1,2-bisz(2-klóretoxi)etánt 18,0 g (120 mmol) nátrium-jodiddal 30 ml aceton oldószerben 24 órán át refluxáltattunk. A kivált nátrium-kloridot leszűrtük, az acetont leróttuk. A visszamaradt olajat 100 cm^3 dietil-éterben oldottuk és kétszer 50 cm^3 telített nátrium-tioszulfát-oldattal kiráztuk. Az éteres fázist MgSO_4 felett szárítottuk, szűrtük, majd az étert csökkentett nyomáson elpárologtattuk. A termék: halványsárga olaj, 16,2 g (43,2 mmol). Hozam: 83%

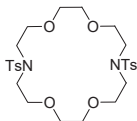


2-(2-(2-(tozilamino)etoxi)etoxi)-N-toziletánamin⁸⁹:

12,5 g (85 mmol) 1,8-diamino-3,6-dioxaoktánt feloldottunk 150 ml vízben, majd 6,3 g nátrium-hidroxidot adtunk hozzá 20 ml vízben. 40,0 g (210 mmol) tozil-kloridot oldottunk 80 ml dietil-éterben, ezt az oldatot hozzáadtuk az első oldathoz, és 1 órát kevertettük szobahőmérsékleten, kb. 25°C-on. A keletkező olajat még nátrium-hidroxid hozzáadásával oldottuk fel és további 3 órán át kevertettük a reakcióelegyet, majd állni hagytuk egy éjszakán át. A tiszta éteres fázist elkülönítettük és 120 ml 1M nátrium-hidroxiddal mostuk. A vizes fázisokat összeöntöttük, majd tömény koncentrált sósavoldattal pH = 3-ra savanyítottuk. Az elkülönült olajat diklór-metánnal extraháltuk, majd kétszer mostuk vizes telített nátrium-klorid só oldattal, és magnézium-szulfát felett szárítottuk, és szűrtük. Az oldószer elpárologtatása után vákuum alatt szárítottuk a kapott olajat, ami lassan kikristályosodott. A fehér kristályokat nagyobb mennyiségű éterben kevertettük a kiindulási tozil-klorid

eltávolítása érdekében, majd szűrés következett. A termék NMR spektruma megegyezett az irodalomban leírttal, így további tisztítás nélkül használtuk fel. A termék fehér, porózus anyag 26,4 g (57,8 mmol). Hozam: 68%

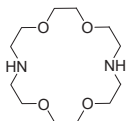
$^1\text{HNMR}$ (CDCl_3) δ = 2.34 (6H, s), 2.98 - 3.10 (4H, m), 3.44 (8H, t, 5.5 Hz), 5.43 (2H, bs, 2×NH), 7.22 (4H, d, J = 8.4 Hz), 7.68 (4H, d, J = 8.4 Hz) $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ = 21.4, 42.8, 69.6, 70.3, 127.0, 129.6, 136.9, 143.3.



7,16-bisz(p-tolilszulfonil)-1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaoktadekán⁹⁰:

2-(2-(2-(tozilamino)etoxi)etoxi)-N-toziletánamin 8,0 g-jának (17,5 mmol) és az 1,2-bisz(2-jódetoxi)etán 6,49 g-jának (17,5 mmol) acetonitriles (90 ml) oldatát izzított kálium-karbonát 12,1 g-jának (90 mmol) jelenlétében kevertettük reflux alatt 24 órán át. A kálium-karbonátot cellites szűréssel távolítottuk el, majd az acetonitrilt csökkentett nyomáson elpárologtattuk, a kivált fehér szilárd anyagot metanollal alaposan megmosva, átdörzsölve a kívánt terméket kaptam. A termék NMR spektruma megegyezett az irodalomban leírttal, így további tisztítás nélkül használtuk fel. A termék fehér, szilárd anyag, 4,31 g (7,56 mmol). Hozam: 43%

$^1\text{HNMR}$ (CDCl_3) δ = 2.40 (6H, s), 3.35 (8H, t, J = 6.2 Hz), 3.54 (8H, s), 3.64 (8H, t, J = 6.2 Hz), 7.28 (4H, d, J = 8.2 Hz), 7.66 (4H, d, J = 8.2 Hz) $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ = 21.4, 49.1, 70.5, 70.6, 127.0, 129.6, 136.2, 143.3.

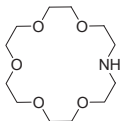


1,10-diaza-18-korona-6-éter⁹¹:

1,2 g (2,10 mmol) 7,16-bisz(p-tolilszulfonil)-1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaoktadekánt 48 ml abszolútizált tetrahidrofuranban szuszpendáltattunk és 0,79 g (20,8 mmol) lítium-alumíniumhidrid absz. tetrahidrofurános (24 ml) forrásban lévő oldatához adtuk. Ezt a reakcióelegyet 20 órán át refluxáltattuk, kevertetés mellett. A redukálószer elbontását hűtés mellett 1,6 ml etil-acetát, 0,8 ml víz, 0,8 ml 15%-os nátrium-hidroxid, majd még 2,4 ml víz hozzáadásával végeztük. Ezután még 1 órán át kevertettük a reakcióelegyet, majd celliten

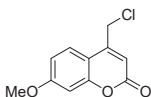
szűrtük, és a szilárd anyagot etil-acetáttal és diklór-metánnal mostuk. A rotálás után maradt fehér kristályokat kis mennyiségű hexánból kristályosítottuk át. A termék NMR spektruma megegyezett az irodalomban leírttal, így további tisztítás nélkül használtuk fel. A termék fehér tűszerű kristályok 0,31 g (1,18 mmol). Hozam: 56%

^1H NMR (CDCl_3) δ = 2.52 (2H, bs), 2.79 (8H, t, J = 4.7 Hz), 3.56 – 3.65 (16H, m). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ = 49.3, 70.2, 70.4.



1-aza-18-korona-6-éter⁹²:

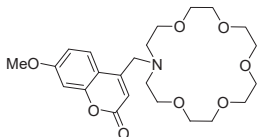
3,15 g (0,03 mol) dietanolamint és 10,0 g (0,09 mol) kálium-*tert*-butoxidot feloldottuk 200 ml *tert*-butil-alkoholban 40°C-on. Ehhez az oldathoz 15,0 g (0,03 mol) tetraetilénglikolditozilát dioxános (150 ml) oldatát csepegtettük hozzá 40°C-on 3 órán át. A beadagolást követően még 1 órán át kevertettük a reakcióelegyet, majd szűrés után az oldószert elpárologtattuk. A maradékhoz 25 ml vizet adtunk, és megmostuk hexánnal, majd diklórmetánnal (5*25 ml) extraháltuk. Az egyesített diklórmetános fázisokat MgSO_4 felett szárítottuk szűrtük, majd bepároltuk. A termék NMR spektruma megegyezett az irodalomban leírttal, így további tisztítás nélkül használtuk fel. A termék fehér, kristályos szilárd anyag, 2,36 g (9 mmol). Hozam: 30%



4-(klórmetil)-7-metoxi-2H-kromen-2-on³⁹:

Jeges vízzel hűtött 100 ml tömény kénsav-oldathoz 5,0 g (40,2 mmol) 3-metoxi-fenol és 7,0 g (42,5 mmol) etil-klóracetóacetát elegyét csepegtettünk, a reakcióelegy hőmérsékletet 15°C alatt tartva, amit ezután 15 órán át szobahőn kevertettünk, majd 400 ml jeges vízre öntöttünk. A kivált csapadékot szűrővel különítettük el, vízzel, 5%-os nátrium-hidroxid-oldattal és ismét vízzel mostuk. A szárítást követően a terméket átkristályosítottuk etil-alkoholból. A termék NMR spektruma megegyezett az irodalomban leírttal, így további tisztítás nélkül használtuk fel. A termék sárgásfehér szilárd por, 2,25g (10,0mmol). Hozam: 25%

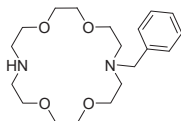
^1H NMR (CDCl_3) δ = 3.87 (3H, s), 4.62 (2H, s), 6.39 (1H, s), 6.84 (1H, bs), 6.89 (4H, d, J = 2.2 Hz, J = 8.8 Hz), 7.56 (4H, d, J = 8.7 Hz) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ = 41.3, 55.8, 101.2, 110.7, 112.54, 112.56, 112.6, 125.1, 149.6, 155.7, 162.9.



1-(4-metil-7-metoxi-kumarin)-1-aza-18-korona-6-éter³⁴:

A kiindulási anyagokat, 260 mg (1,16 mmol) 4-(klórmetil)-7-metoxi-2H-kromen-2-ont és 600 mg (2,28 mmol) 1-aza-18-korona-6-étert feloldottuk 30 ml diklórmetánban, majd katalitikus mennyiségű kálium-jodid jelenlétében kevertettük. A reakciót vékonyréteg-kromatográfián követtük. A nyerterméket oszlopkromatográfián tisztítottuk, etil-acetát eluenssel. Az így kapott termék analitikai tisztaságú. A termék szintelen olaj, 200 mg (0,44 mmol). Hozam: 38%

^1H NMR (CDCl_3) δ = 2.85 (4H, t, J = 4.82 Hz), 3.6-3.8 (22H, m), 3.92 (3H, s), 6.53 (1H, s), 6.82 (1H, d, J = 2.6 Hz), 6,88 (1H, dd, J = 2.6 Hz, J = 8.8 Hz), 7.81 (1H, d, J = 8.8 Hz); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ = 56.6, 58.1, 68.8, 70.9, 71.0, 71.2, 101.9, 112.9, 113.6, 114.4, 126.9, 156.0, 157.1, 163.1, 164.6.

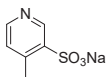


1-benzil-1,10-diaza-18-korona-6-éter⁹³:

670 mg (2,55 mmol) 1,10-diaza-18-korona-6-étert oldottunk 30 ml acetonitrilben, 1,05 g (7,65 mmol) kiiztított kálium-karbonátot adtunk hozzá, majd 329 mg (2,55 mmol) benzil-kloridot nagy hígításban (20 ml acetonitril) fél óra alatt csepegtettünk a lombikba. A reakcióelegyet 1 napig refluxáltattuk, majd a bázis celites kiszűrése után oszlopkromatográfián tisztítottuk acetone / acetone:TEA (10:1 v/v%) eluens segítségével. A termék sárga olaj, 360 mg (1,02 mmol). Hozam: 40% /A dibenzilezett koronaéter-származék sárga olaj, 100 mg (0,226mmol). Hozam: 9%/

^1H NMR (CDCl_3) δ = 2.75 (8H, t, J = 5.7 Hz), 3.49 - 3.59 (16H, m), 3.61 (2H, s), 7.16 – 7.32 (10H, m) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ = 49.1, 53.4, 59.5, 69.9, 70.0, 70.1, 70.7, 126.5, 127.9, 128.6, 139.6.

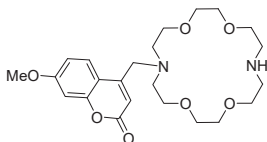
/dibenzilezett: ^1H NMR (CDCl_3) δ = 2.80 (8H, t, J = 5.2 Hz), 3.52 - 3.66 (16H, m), 3.68 (2H, s), 7.22 – 7.36 (5H, m) /



nátrium-4-metilpiridin-3-szulfonát⁹⁴:

53,0 g 20%-os óleumot és katalitikus mennyiségű (210 mg) higany-szulfátot tettünk a reakcióedénybe, ehhez csepegtettük szobahőmérsékleten a 10,0 g (0,107 mol) 4-pikolint. A beadagolást követően a hőmérsékletet 225-235°C-ra emeltük, és 5 órán át itt tartottuk. Ezután a reakcióelegyet jeges fürdőbe hűtöttük és 50%-os NaOH-oldat segítségével pH 9-10-ig lúgosítottuk. Az oldószert bepároltuk, majd a terméket metanollal extraháltuk. A metanolos oldatot bepárolva jutottunk a nyertermékhez (12,3 g, 63,0 mmol, 59%), amit etanolból átkristályosítva eredményezte a tiszta terméket. ^1H (DMSO- d_6) δ = 2.53 (3H, s); 7.20 (1H, d, J = 4.9 Hz); 8.37 (1H, d, J = 4.9 Hz); 8.79 (1H, s). ^{13}C (DMSO- d_6) δ = 19.4; 125.7; 141.4; 144.9; 146.9; 149.7. m.p.: >240 °C. IR (neat) ν = 3052, 1230, 1213 cm^{-1} . HRMS (ESI) számolt: $\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_3\text{S}^- [\text{M}-\text{Na}]^-$: 172.0074; mért: 172.0078.

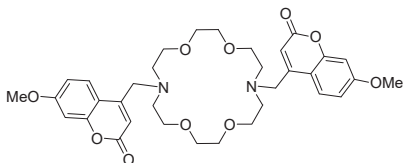
7.2. Új vegyületek szintézise



1-(4-metil-7-metoxi-kumarin)-1,10-diaza-18-korona-6-éter:

300 mg (1,14 mmol) 1,10-diaza-18-korona-6-éter, 441 mg (2,28 mmol) cézium-karbonát és 10 mg (0,06 mmol) kálium-jodid absz. tetrahydrofurános oldatát (20 ml) refluxig melegítettük, majd hozzácsepegtettük 272 mg (1,21 mmol) 4-(klórmetil)-7-metoxi-2H-kromen-2-on tetrahydrofurános oldatát (40 ml) 2,5 óra alatt. A beadagolást követően a reakcióelegyet 18 órán át refluxáltattuk, majd szobahőre hűtve celiten szűrtük. A nyerterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk acetone / acetone:TEA (9:1 v/v%) eluens segítségével. A

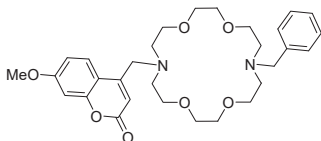
termék sárga olaj, 130 mg (0,29 mmol), Hozam: 25% $R_f = 0,11$ (10% MeOH CH_2Cl_2 -ben), IR (neat) $\nu = 1608, 1713, 2864, 3380 \text{ cm}^{-1}$. ^1H NMR (CDCl_3) $\delta = 2.71$ (4H, t, $J = 4.7 \text{ Hz}$, $2 \times \text{-NCH}_2(\text{korona})$), 2.78 (4H, t, $J = 5.4 \text{ Hz}$, $2 \times \text{-NCH}_2(\text{korona})$), $3.42 - 3.60$ (17H, m, $8 \times \text{-CH}_2(\text{korona}) + \text{NH-}$), 3.76 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.80 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-}$), 6.37 (1H, s, $\text{CH}_{\text{C3}}(\text{kumarin})$), 6.69 (1H, d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{\text{C8}}(\text{kumarin})$), 6.69 (1H, dd, $J = 2.5 \text{ Hz}$, $J = 8.9 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{\text{C6}}(\text{kumarin})$), 7.74 (1H, d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{\text{C5}}(\text{kumarin})$). ^{13}C NMR (CDCl_3) $\delta = 49.4, 53.8, 55.4, 56.3, 69.9, 70.1, 70.7, 100.4, 111.2, 111.8, 112.3, 125.8, 153.9, 155.3, 161.4, 162.1$. HRMS (ESI) $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt 451.2439, mért 451.2446.



1,10-bisz(4-metil-7-metoxi-kumarin)-1,10-diaza-18-korona-6-éter:

264 mg (1,0mmol) 1,10-diaza-18-korona-6-étert és 451 mg (2,0mmol) 4-klórmetil-7-metoxi-kumarint 564mg refluxoltattunk 20 órán át 45ml acetonitrilben, 0,3 ml trietil-amin jelenlétében. A reakció előrehaladtával a termék az oldatból kivált. A reakcióidő elteltével a terméket leszűrtük, acetonitrillel mostuk. Oszlopkromatográfiásan tisztítottuk, az eluens diklórmetán:metanol 40:1 v/v% arányú elegye volt. Az így kapott termék analitikai tisztaságú. A termék fehér, szilárd por 395 mg (0,62 mmol). Hozam: 62%

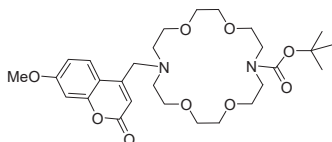
^1H -NMR (CDCl_3) $\delta = 2.76$ (8H, t, $J = 5,5\text{Hz}$); 3.55 (8H, s); 3.60 (8H, t, $J = 5,7\text{Hz}$); 3.76 (4H, s); 3.80 (6H, s); 6.53 (2H, s); 6.66 (2H, d, $J = 2,5\text{Hz}$); 6.75 (2H, dd, $J = 2,5\text{Hz}$, $J = 8,9\text{Hz}$); 7.64 (2H, d, $J = 8,9\text{Hz}$); Elemanalízis: számított: C: 63,94%, H: 6,63%, N: 4,39%, talált: C: 63,19%, H: 6,61%, N: 4,32% ; $\lambda_{\text{abs}} = 323 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{flu}} = 395 \text{ nm}$.



1-benzil-10-(4-metil-7-metoxi-kumarin)-1,10-diaza-18-korona-6-éter:

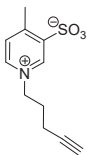
360 mg (1,60 mmol) 4-(klórmetil)-7-metoxi-2H-kromen-2-ont és 360 mg (1,02 mmol) 1-benzil-1,10-diaza-18-korona-6-étert tietilamin (0,42 ml) jelenlétében diklórmetánban refluxáltattunk 12 órán át. A reakcióelegyet bepároltuk, és oszlopkromatográfiásan tisztítottuk

diklórmétán / metanol 50:1 v/v%-ú elegyével. A termék sárga olaj, 130 mg (0,24 mmol). Hozam: 24% $R_f = 0,20$ (10% MeOH CH_2Cl_2 -ben), IR (neat) $\nu = 1610, 1715, 2860, 3059 \text{ cm}^{-1}$. ^1H NMR (CDCl_3) $\delta = 2.72 - 2.87$ (8H, m, $4 \times \text{-NCH}_2(\text{korona})$), $3.46 - 3.70$ (18H, m, $8 \times \text{-CH}_2(\text{korona}) + \text{CH}_2$ -), 3.77 (2H + 3H, s, CH_2 -, CH_3O -), 6.43 (1H, s, $\text{CHC}_3(\text{kumarin})$), $6.70 - 6.79$ (2H, m, $\text{CH}_{6,8}(\text{kumarin})$), $7.10 - 7.30$ (5H, m, Ar), 7.69 (1H, d, $J = 8,8 \text{ Hz}$, $\text{CHC}_5(\text{kumarin})$). ^{13}C NMR (CDCl_3) $\delta = 53.3, 53.5, 54.3, 55.5, 56.4, 59.5, 69.4, 69.5, 69.7, 70.5, 100.5, 111.3, 111.9, 112.3, 125.6, 126.9, 128.0, 128.9, 138.6, 153.8, 155.3, 161.4, 162.2$. HRMS (ESI) $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt 541.2914, mért 541.2953.



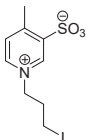
1-hangyasav-*t*-butil-észter-10-(4-metil-7-metoxi-kumarin)-1,10-diaza-18-korona-6-éter:

110 mg (0,24 mmol) 1-(4-metil-7-metoxi-kumarin)-1,10-diaza-18-korona-6-étert és 0,69 ml trietilamint 3 ml toluolban refluxig melegítettünk, majd hozzácepegettük 51 mg (0,34 mmol) *t*-butilklóracetátot toluolos (3 ml) oldatban 3 perc alatt. Katalitikus mennyiségű kálium-jodidot (10 mg, 0,06 mmol) adtunk a reakcióelegyhez, majd 18 órán át refluxáltattuk. A reakcióelegyet bepároltuk, majd 10 ml diklórmétánban oldottuk és kétszer 10 ml vízzel mostuk. A szerves fázist megszárítva, és bepárolva oszlopkromatográfiásan tisztítottuk aceton / aceton:TEA (9:1 v/v%) eluens segítségével. A termék sárga olaj, 80 mg (0,14 mmol). A hozam: 58%. $R_f = 0,18$ (10% MeOH CH_2Cl_2 -ben), IR (neat) $\nu = 1610, 1717, 2865 \text{ cm}^{-1}$. ^1H NMR (CDCl_3) $\delta = 1.43$ (9H, s, $3 \times \text{CH}_3$), 2.84 (4H, t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, $2 \times \text{-NCH}_2(\text{korona})$), 2.94 (4H, t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, $2 \times \text{-NCH}_2(\text{korona})$), 3.36 (2H, s, CH_2 -), $3.52 - 3.65$ (16H, m, $8 \times \text{-CH}_2(\text{korona})$), 3.82 (2H, s, CH_2 -), 3.84 (3H, s, CH_3O -), 6.45 (1H, s, $\text{CHC}_3(\text{kumarin})$), $6.76 - 6.84$ (2H, m, $\text{CH}_{6,8}(\text{kumarin})$), 7.76 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, $\text{CHC}_5(\text{kumarin})$). ^{13}C NMR (CDCl_3) $\delta = 28.1, 54.0, 54.4, 55.6, 56.6, 57.0, 69.9, 70.1, 70.6, 70.7, 80.7, 100.6, 111.5, 112.0, 112.4, 125.8, 153.9, 155.5, 161.5, 162.3, 170.9$. HRMS (ESI) $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt 565.3125, mért 565.3141.



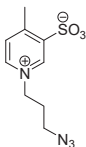
1-(5-pentin-1-yl)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betain:

1,0 g (5.12 mmol) nátrium-4-metilpiridin-3-szulfonátot és 2,10 g, (10,8 mmol) 5-jód-1-pentint refluxáltattunk dimetilformamidban 14 órán át. A reakcióelegyet bepároltuk, majd oszlopkromatográfiásan tisztítottuk diklórmetán / metanol / TEA 10:1:0.1 v/v%-ú elegyével. A termék sárga szilárd anyag, 0,86 g (3,59 mmol). Hozam: 70%. ^1H (DMSO- d_6) δ = 2.08 (2H, quint., J = 7.1 Hz); 2.21 – 2.30 (2H, m); 2.79 (3H, s); 2.85 (1H, t, J = 2.7 Hz); 4.63 (2H, t, J = 7.1 Hz); 8.01 (1H, d, J = 6.2 Hz); 8.92 (1H, dd, J = 1.4 Hz, J = 6.2 Hz); 9.09 (1H, d, J = 1.4 Hz). ^{13}C (DMSO- d_6) δ = 14.7; 20.2; 29.2; 59.2; 72.3; 82.4; 129.8; 141.4; 144.0; 145.4; 156.7. m.p.: 175-179 °C. IR (neat) ν = 3278, 3044, 2935, 1213 cm^{-1} . HRMS (ESI) számolt: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 240.0689; mért: 240.0685.



1-(3-jódpropil)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betain:

1,0 g (5.12 mmol) nátrium-4-metilpiridin-3-szulfonátot és 6,06 g (20,5 mmol) 1,3-dijódpropánt dimetilformamidban refluxáltattuk 4 órán át. A reakcióelegyet bepároltuk, majd oszlopkromatográfiásan tisztítottuk diklórmetán / metanol 10:1-től 5:1-ig v/v%-ú elegyével. A termék sárga szilárd anyag, 1,43 g (4,19 mmol). Hozam: 82%. ^1H (DMSO- d_6) δ = 2.42 (2H, quint., J = 7.3 Hz); 2.78 (3H, s); 3.21 (2H, t, J = 7.3 Hz); 4.61 (2H, t, J = 7.1 Hz); 8.01 (1H, d, J = 6.3 Hz); 8.92 (1H, dd, J = 1.4 Hz, J = 6.2 Hz); 9.09 (1H, d, J = 1.3 Hz). ^{13}C (DMSO- d_6) δ = 1.3; 20.2; 34.1; 60.5; 129.8; 141.4; 143.9; 145.4; 156.7. m.p.: 136-139 °C. IR (neat) ν = 3110, 3033, 2952, 1213 cm^{-1} . HRMS (ESI) számolt: $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{INO}_3\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 341.9655; mért: 341.9649.

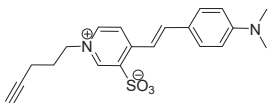


1-(3-azidopropil)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betain:

0,85 g (2,5 mmol) 1-(3-jódpropil)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betaint és 0,49 g (7,5 mmol) nátrium-azidot oldottunk 40 ml acetonitrilben, és 5 ml dimetil-formamidban és refluxáltattuk 3 órán át. A reakcióelegyből kiszűrtük a szervesetlen sókat, és szárazra pároltuk. A visszamaradó anyagot diklórmetánban oldottuk, és kiszűrtük a maradék sókat, majd szilikán átszűrtük. Bepárolva az oldatot 0,6 g (2,34 mmol) sárga, kristályos termékhez jutottunk. Hozam: 94%. ^1H (DMSO- d_6) δ = 2.15 (2H, quint., J = 6.6 Hz); 2.78 (3H, s); 3.45 (2H, t, J = 6.6 Hz); 4.64 (2H, t, J = 7.1 Hz); 8.03 (1H, d, J = 6.3 Hz); 8.95 (1H, dd, J = 1.4 Hz, J = 6.3 Hz); 9.10 (1H, d, J = 1.3 Hz). ^{13}C (DMSO- d_6) δ = 20.1; 29.7; 47.5; 57.6; 129.7; 141.4; 144.0; 145.3; 156.6. m.p.: 94-97 °C. IR (neat) ν = 3023, 2098, 1214 cm^{-1} . HRMS (ESI) számolt: $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 257.0703; mért: 257.0698.

Általános eljárás a fluoreszcens jelzőmolekulák előállítására pikolin-kondenzációval

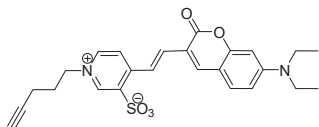
A reakciókat 16 órán át, 60°C-ra melegítve Vigreux-kolonnát használva végeztük, katalitikus mennyiségű (6 csepp) piperidin jelenlétében. Oldószerként etanolt használtunk.



1-(5-pentin-1-il)-4-([E]-2-(4-dimetilaminofenil)-vinil)-3-szulfonát piridínium betain:

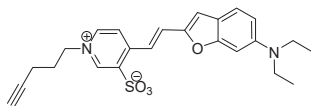
250 mg (1,05 mmol) 1-(5-pentin-1-il)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betaint és 156 mg (1,05 mmol) and 4-(dimetilamino)-benzaldehydet reagáltattuk. A reakcióelegyet bepárolva, oszlopkromatográfiásan tisztítottuk diklórmetán / metanol 9:1 v/v%-ú elegyével. A termék piros színű szilárd anyag, 300 mg (0,81 mmol). Hozam: 77%. ^1H (DMSO- d_6) δ = 2.07 (2H, quint, J = 7.0 Hz); 2.25 - 2.28 (2H, m); 2.87 (1H, t, J = 2.9 Hz); 3.03 (6H, s); 4.51 (2H, t, J = 7.0 Hz); 6.81 (2H, d, J = 8.8 Hz); 7.51 (2H, d, J = 8.8 Hz); 7.92 (2H, AB, J = 15.8 Hz); 8.36 (1H, d, J = 7.0 Hz); 8.70 (1H, d, J = 7.0 Hz); 8.97 (1H, d, J = 1.8 Hz). ^{13}C (DMSO- d_6) δ = 14.7; 29.1; 40.0; 58.2; 72.3; 82.5; 111.9; 116.3; 121.1; 122.8; 130.1; 141.2; 141.9; 142.0;

142.4; 150.8; 151.9. m.p.: >240 °C. IR (neat) ν = 3224, 3072, 2990, 1213 cm^{-1} . HRMS (ESI) számolt: $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 371.1424; mért: 371.1423.



1-(5-pentin-1-il)-4-([E]-2-(7-dietilamino-2-oxo-2H-kromén-3-il)-vinil)-3-szulfonát piridínium betain:

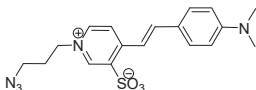
200 mg (0,836 mmol) 1-(5-pentin-1-il)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betaint és 205 mg (0,836 mmol) and 7-dietilamino-2-oxo-2H-kromén-3-karbaldehidet reagáltattuk. A reakcióelegyet bepárolva, oszlopkromatográfiásan tisztítottuk diklórmetán / metanol 9:1 v/v%-ú elegyével. A termék mályva színű szilárd anyag, 350 mg (0,75 mmol). Hozam: 90%. ^1H (DMSO- d_6) δ = 1.14 (6H, t, J = 7.1 Hz); 2.09 (2H, quint, J = 6.6 Hz); 2.22 – 2.32 (2H, m); 2.88 (1H, t, J = 2.7 Hz); 3.48 (4H, q, J = 6.6 Hz); 4.57 (2H, t, J = 7.1 Hz); 6.61 (1H, d, J = 2.2 Hz); 6.77 (1H, dd, J = 2.4 Hz, J = 9.0 Hz); 7.60 (1H, d, J = 9.0 Hz); 7.75 (1H, d, J = 16.3 Hz); 8.13 (1H, s); 8.35 (1H, d, J = 16.2 Hz); 8.39 (1H, d, J = 6.9 Hz); 8.81 (1H, d, J = 6.6 Hz); 9.07 (1H, d, J = 1.3 Hz). ^{13}C (DMSO- d_6) δ = 12.3; 14.7; 29.2; 44.2; 58.6; 72.3; 82.4; 96.2; 108.2; 109.8; 114.3; 121.9; 122.4; 130.7; 136.1; 142.3; 142.4; 143.1; 143.6; 150.8; 151.8; 156.3; 159.5. m.p.: >240 °C. IR (neat) ν = 3272, 3073, 2971, 1610, 1185 cm^{-1} . HRMS (ESI) számolt: $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 467.1635; mért: 467.1624.



1-(5-pentin-1-il)-4-([E]-2-(6-dietilamino-benzofurán-2-il)-vinil)-3-szulfonát piridínium betain:

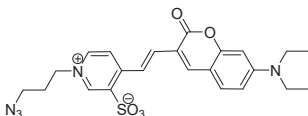
150 mg (0,631 mmol) 1-(5-pentin-1-il)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betaint és 160 mg (0,631 mmol) and 6-dietilamino-benzofurán-2-karbaldehid hidroklorid sóját reagáltattuk 1.2 ekvivalens piperidin jelenlétében. A reakcióelegyet bepárolva, oszlopkromatográfiásan tisztítottuk diklórmetán / metanol 9:1 v/v%-ú elegyével. A termék mélylila szilárd anyag, 56 mg (0,13 mmol). Hozam: 20%. ^1H (DMSO- d_6) δ = 1.14 (6H, t, J = 7.0 Hz); 2.08 (2H, quint, J = 7.0 Hz); 2.21 – 2.34 (2H, m); 2.89 (1H, t, J = 2.4 Hz); 3.44 (4H, q, J = 7.0 Hz); 4.53 (2H, t, J = 7.0 Hz); 6.76 (1H, dd, J = 1.9 Hz, J = 8.8 Hz); 6.88 (1H, s); 7.17 (1H, s); 7.48 (1H, d, J =

8.8 Hz); 7.93 (2H, AB, J = 15.9 Hz); 8.38 (1H, d, J = 7.0 Hz); 8.76 (1H, d, J = 7.0 Hz); 9.03 (1H, s). ^{13}C (DMSO- d_6) δ = 12.3; 14.8; 29.1; 44.2; 58.5; 72.3; 82.5; 92.2; 110.2; 114.5; 117.2; 118.4; 121.7; 122.6; 127.7; 141.8; 142.2; 142.8; 148.2; 149.7; 150.7; 158.5. m.p.: >240 °C. IR (neat) ν = 3280, 2968, 2362 cm^{-1} . HRMS (ESI) száolt: $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 439.1686; mért: 439.1682.



1-(3-azidopropil)-4-([E]-2-(4-dimetilaminofenil)-vinil)-3-szulfonát piridínium betain:

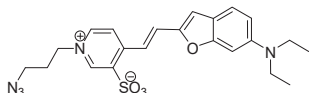
300 mg (1,20 mmol) 1-(3-azidopropil)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betaint és 175 mg (1,20 mmol) 4-(dimetilamino)-benzaldehyd reagáltattunk. A reakció a vékonyrétegekromatográfiás követés szerint, már 3 óra alatt teljesen végbement. A reakcióelegyet bepárolva, oszlopkromatográfiásan tisztítottuk diklórmetán / metanol 9:1 v/v%-ú elegyével. A termék mély vörös, szilárd anyag, 256 mg (0,66 mmol). Hozam: 56%. ^1H (DMSO- d_6) δ = 2.14 (2H, quint, J = 6.5 Hz); 3.02 (6H, s); 3.45 (2H, t, J = 6.5 Hz); 4.52 (2H, t, J = 6.5 Hz); 6.80 (2H, d, J = 8.2 Hz); 7.51 (2H, d, J = 8.5 Hz); 7.93 (2H, AB, J = 15.9 Hz); 8.39 (1H, d, J = 6.5 Hz); 8.72 (1H, d, J = 6.5 Hz); 8.97 (1H, s). ^{13}C (DMSO- d_6) δ = 29.6; 43.7; 47.6; 56.8; 111.9; 116.2; 121.2; 122.8; 125.6; 130.1; 141.1; 142.1; 142.5; 150.7; 151.9. m.p.: 188 - 191°C. IR (neat) ν = 2905, 2095, 1564, 1524, 1158 cm^{-1} . HRMS (ESI) számolt: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 388.1438; mért: 388.1429.



1-(3-azidopropil)-4-([E]-2-(7-diethylamino-2-oxo-2H-kromén-3-yl)-vinil)-3-szulfonát piridínium betain:

210 mg (0,815 mmol) 1-(3-azidopropil)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betaint és 200 mg (0,815 mmol) 7-diethylamino-2-oxo-2H-kromén-3-karbaldehyd reagáltattunk. A reakcióelegyet bepárolva, oszlopkromatográfiásan tisztítottuk acetonitril / acetonitril – NH_4PF_6 eluenssel. A termék sötét színű szilárd anyag, 120 mg (0,25 mmol). Hozam: 36%. ^1H (DMSO- d_6) δ = 1.15 (6H, t, J = 7.1 Hz); 2.17 (2H, quint, J = 6.9 Hz); 3.45 – 3.51 (6H, m); 4.58 (2H, t, J = 6.9 Hz); 6.62 (1H, d, J = 2.4 Hz); 6.78 (1H, dd, J = 2.4 Hz, J = 8.9 Hz); 7.61

(1H, d, J = 8.9 Hz); 7.76 (1H, d, J = 16.3 Hz); 8.14 (1H, s); 8.37 (1H, d, J = 16.3 Hz); 8.39 (1H, d, J = 6.9 Hz); 8.82 (1H, dd, J = 1.2 Hz, J = 6.9 Hz); 9.09 (1H, d, J = 1.2 Hz). ¹³C (DMSO-d₆) δ = 12.3; 29.6; 44.2; 47.6; 57.1; 96.2; 108.2; 109.8; 121.9; 122.4; 130.7; 136.1; 142.3; 142.4; 143.2; 143.3; 143.6; 150.8; 151.8; 156.3; 159.5. m.p.: >240 °C. IR (neat) ν = 3047, 2928, 2086, 1714, 1515 cm⁻¹. HRMS (ESI) számolt: C₂₃H₂₆N₅O₅S⁺ [M+H]⁺: 484.1649; mért: 484.1644.



1-(3-azidopropil)-4-([E]-2-(6-diethylamino-benzofurán-2-yl)-vinil)-3-szulfonát piridínium betain:

209 mg (0,815 mmol) 1-(3-azidopropil)-3-szulfonát-4-metilpiridínium betaint és 207 mg (0.815 mmol) 6-diethylamino-benzofurán-2-karbaldehyd hidroklorid sóját reagáltattuk 1.2 ekvivalens piperidin jelenlétében. A reakcióelegyet bepárolva, oszlopkromatográfiásan tisztítottuk acetonitril / acetonitril – NH₄PF₆ eluenssel. A termék mélylila szilárd anyag, 102 mg (0,22 mmol). Hozam: 27%. A termék sötétlila, szilárd anyag. ¹H (DMSO-d₆) δ = 1.14 (6H, t, J = 7.0 Hz); 2.16 (2H, quint, J = 7.0 Hz); 3.41 – 3.59 (6H, m); 4.55 (2H, t, J = 7.0 Hz); 6.76 (1H, dd, J = 2.3 Hz, J = 8.8 Hz); 6.88 (1H, s); 7.18 (1H, s); 7.48 (1H, d, J = 8.8 Hz); 7.93 (2H, AB, J = 15.8 Hz); 8.39 (1H, d, J = 7.0 Hz); 8.78 (1H, d, J = 7.0 Hz); 9.05 (1H, d, J = 1.8 Hz). ¹³C (DMSO-d₆) δ = 12.3; 29.6; 44.2; 47.6; 57.0; 92.2; 110.2; 114.5; 117.2; 118.4; 121.7; 122.7; 127.7; 141.8; 142.3; 142.8; 148.2; 149.7; 150.7; 158.5. m.p.: 163-166 °C. IR (neat) ν = 3044, 2100, 1559 cm⁻¹. HRMS (ESI) számolt: C₂₂H₂₆N₅O₄S⁺ [M+H]⁺: 456.1700; mért: 457.1692.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek Kele Péternek és Kotschy Andrásnak a rengeteg szakmai és baráti segítséget, a munkám irányítására fordított energiát és türelmet, amit nemcsak a doktori munkám ideje alatt, hanem az együtt eltöltött öt év során kaptam.

Külön köszönettel tartozom Novák Zoltánnak a mérhetetlen sok szakmai tanácsért.

Köszönöm az analitika terén nyújtott értékes segítséget Torkos Kornélnak, Eke Zsuzsannának, Magyarfalvi Gábornak, és Tarczay Györgynek.

Köszönöm partnereink hatékony és eredményes közreműködését, Béni Szabolcsnak a Semmelweis Egyetetről, valamint Orbán Erikának és Bösze Szilviának az MTA Peptidkémiai kutatócsoportjából.

Köszönöm kutatócsoportunk minden tagjának (Bíró Andrea Beatrix, Bostai Beatrix, Csékei Márton, Daru János, Dénes Júlia, Faragó János, Gonda Zsombor, Herner András, Komáromi Anna, Komáromy Dávid, Kovács Szabolcs, Kun Vilibald, Lőrincz Krisztián, Májer Ferenc, Nagy András, Nagy Tibor Zsigmond, Paczal Attila, Szabó Barna, Tolnai Gergely, Varga Balázs), hogy mind szakmai segítségükkel, mind a baráti légkör megteremtésével nagy mértékben hozzájárultak munkám sikeréhez.

Köszönöm továbbá a következő személyeknek a támogatást és segítséget, amellyel körülvettek és az egyetemen eltöltött évek alatt munkám eredményességéhez hozzájárultak: Csákvári Béla, Csámpai Antal, Dobó Attila, Hajós György, Jalsovszky István, Kovácsné Juhász Éva, Mörtl Mária, Pongor Gábor, Rábai József, Rohonczy János, Sohár Pál, Szabó Dénes, Szalay Roland, Szepes László, Timári Géza, Tölgyesi László, Vass Gábor.

Köszönöm Soós Tibornak és jelenlegi munkatársaimnak a sok segítséget, türelmet, megértést, és a buzdítást, amivel a dolgozat megírását segítették.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetemet szeretném kifejezni családomnak és barátaimnak a lelki támogatásért, s hogy mindvégig bátorítottak, és kitartottak mellettem a nehézségek ellenére is.

8. Irodalomjegyzék

-
- ¹ Bryan A. J., de Silva A.P., de Silva S. A., Rupasinghe R. A. D. D., Sandanayake K. R. A. S., *Biosensors*, **1989**, 4, 169.
- ² Bissell R. A., de Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Lynch P. L. M., Maguire G. E. M., Sandanayake K. R. A. S., *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21, 187.
- ³ Lehn J.-M., *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, **1995**.
- ⁴ (a) Goodwin P. M., Ambrose, W. P. Keller R. A., *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 607-613. (b) Mets U., Rigler R., *J. Fluoresc.* **1994**, 4, 259.
- ⁵ (a) Moerner W. E., Basche T., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 457. (b) Moerner W. E., *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 563.
- ⁶ (a) *Fibre Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Wolfbeis O. S., Ed.; CRC Press: Boca Raton, **1991**; Vols. 1 and 2. (b) *Biosensors and Fiberoptics*, Wise D. L., Wingard L. B., Eds.; Humana Press, Clifton, **1991**.
- ⁷ de Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Gunnlaugsson T., Huxley A. J. M., McCoy C. P., Rademacher J. T., Rice T. E., *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515.
- ⁸ Wang X., Zheng W., Lin H., Liu G., Chen Y., Fang J., *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 1536.
- ⁹ Maitra U., Nath S., *Chem. -- An Asian J.*, **2009**, 4, 989.
- ¹⁰ Grabchev I., Dumas S., Chovelon J.-M., Nedelcheva A., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 2113.
- ¹¹ Wang J., Ha C.-S., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 1846.
- ¹² Veale E. B., Tocci G. M., Pfeffer F. M., Kruger P. E., Gunnlaugsson T., *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 3447.
- ¹³ Mao H., Thorne J. B., Pharr J. S., Gawley R. E., *Can. J. of Chem.*, **2006**, 84, 1273.
- ¹⁴ Clark R. F., Williams S. R., Nordt S.P., Manoguerra A.S., *Undersea Hyperb Med.*, **1999**, 26, 175.
- ¹⁵ Langhals, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 724.
- ¹⁶ Park, H.-R., Lee, H.-C., Kim, T. H., Lee, J.-K., Yang, K. Bark, K.-M., *Photochemistry and Photobiology*, **2000**, 71, 281.
- ¹⁷ Suresh M., Das A., *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 5808.
- ¹⁸ (a) Tsien R. Y. In *Optical Methods in Cell Physiology*, de Weer P., Salzberg B. M., Eds., Wiley, New York, **1986**, p 327. (b) Thomas J. A., Kolbeck P. C., Langworthy T. A. In

Nuccitelli R., Deamer D. W., Eds.; Liss: **1982**, New York; p 105.

¹⁹ de Silva A. P., McClenaghan N. D., *Chem.--A Eur. J.*, **2002**, 8, 4935.

²⁰ de Silva A. P., McCaughan B., McKiney B. O. F., Querol M. *Dalton Trans.* **2003**, 1902.

²¹ Ghosh K., Masanta G., *Chemistry Letters*, **2006**, 35, 414.

²² Wang Z., Palacios M. A., Zyryanov G., Anzenbacher P., *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 8540.

²³ (a) Callan J. F., de Silva A. P., Magri, D. C., *Tetrahedron*, **2005**, 61, 8551. (b) Gunnlaugsson T., Glynn M., Tocci G. M., Kruger P. E., Pfeffer F. M., *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 3094. (c) Tal S., Salman H., Abraham Y., Botoshansky M., Eichen Y., *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4858.

²⁴ (a) Gunnlaugsson T., Davis A. P., Glynn M., *Chem. Commun.* **2001**, 24, 2556. (b) Gunnlaugsson T., Davis A. P., Hussey G. M., Tierney J., Glynn M., *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1856.

²⁵ Kim S. K., Yoon J. *Chem. Commun.* **2002**, 7, 770.

²⁶ Kim Y., Huh H.-S., Lee M.-H., Lenov I. L., Zhao H., Gabbai F. P., *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 2057.

²⁷ Lynam, C., Jennings, K., Nolan, K., Kane, P., McKervey, M. A.; Diamond, D. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 59.

²⁸ Arimori G. A., Sonsiglio, A., Phillips, D.; James, T. D. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 4789.

²⁹ Gawley R. E., Zhang Q., Higgs P. I., Wang S., Leblanc R. M., *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5461-5465. Corrigendum 6135.

³⁰ Botana, L. M., Ed. *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection*; Marcel Dekker: New York, 2000.

³¹ (a) Meyer K. F., *New Engl. J. Med.* **1953**, 249, 843. (b) Ayres P. A., Cullum M., *Paralytic Shellfish Poisoning, Technical Report No. 4*; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1978.

³² (a) Shimizu Y., In *Handbook of Natural Toxins*; Tu A. T., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1988**, Vol. 3, 63. (b) Hall S., Strichartz G., Moczydowski E., Ravindran A., Reichardt, P. B., In *Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*; Hall S., Strichartz G., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**, Vol. 418, 29. (c) Kao C. Y., In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*; Falconer I. R., Ed.; Academic Press: London, **1993**, 75.

- ³³ (a) Gessner B. D., Bell P., Doucette G. J., Moczydlowski, E., Poli M. A., Dolah F. V., Hall, S. *Toxicon* **1997**, *35*, 711. (b) de Carvalho M., Jacinto J., Ramos N., de Oliveira V., Melo T. P. E., de Sa J. *J. Neurol.* **1998**, *245*, 551.
- ³⁴ Gawley R. E., Pinet S., Cardona, C. M., Datta, P. K., Ren, T., Guida, W. C., Nydick J., Leblanc R. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13449.
- ³⁵ Huang X., Lu Y., He Y., Chen Z., *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, *10*, 1921.
- ³⁶ Leray I., Valeur B., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, 3525.
- ³⁷ Kele P., Orbulescu J., Calhoun, T. L., Gawley, R. E., Leblanc R. M., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 4413.
- ³⁸ Kele P., Nagy K., Kotschy A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2565.
- ³⁹ Findlay J. A., Mebe P., Stern M. D., Givner M. L., *Can. J. Chem.*, **1980**, *58*, 1427.
- ⁴⁰ Maguire G. E. M., Meadows E. S., Murray, C. L., Gokel, G. W., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6339.
- ⁴¹ (a) Móczar I., Huszthy P., Peragovics Á., Baranyai P., Tóth K., *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 2953. (b) Ho I.-T., Chu J.-H., Chung W.-S., *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *8*, 1472.
- ⁴² (a) Kubo K., Sakurai T. *Chem. Lett.* **1996**, *11*, 959-960. (b) Alihodzic S., Zinic M., Klaić B., Kiralj R., Kojic-Prodic B., Herceg M., Cimerman Z., *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8345.
- ⁴³ Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V 8.14 for Solaris
- ⁴⁴ http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/
- ⁴⁵ Wongsrikeao P., Saenz D., Rinkoski T., Otoi T., Poeschla E., *Nature Methods*, **2011**, doi:10.1038/nmeth.1703
- ⁴⁶ Kato T., *International Congress Series.* **2004**, 1270, 85.
- ⁴⁷ (a) Prescher J. A., Bertozzi C. R., *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13. (b) Chang P. V., Prescher J. A., Hangauer M. J., Bertozzi C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400. (c) Kiick K. L., Saxon E., Tirrell D. A., Bertozzi C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19. (d) Kurpiers T., Mootz H. D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 1729.
- ⁴⁸ Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B. *Angew. Chem Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- ⁴⁹ (a) Felicetta L., Johansson C. M., Campopiano D. J., Hulme A. N., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 56. (b) Angels C. O., Vandezande P., Vankelecom I. F. J., Fournier D., Wim V. C., Du Prez F. E., *Chem.-A Eur. J.*, **2010**, *16*, 1061. (c) Lu W.-Y., Zhu C., Lin G.-Q., Sun X.-W., Xu J.-H., *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 750. (d) Gauthier R., Loic J., Mesini P., Contal C., Schaaf P., Boulmedais F., Thomann J.-S., Ameer N. B., Frisch B., Ponche A., El Haitami A. E., Senger B., Voegel J.-C., *Langmuir*, **2010**, *26*, 2816. (e) Trabocchi A. Menchi G., Cini N.,

-
- Guarna A., Bianchini F., Raspanti S., Bottoncetti A., Pupi A., Calorini L., *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 7119.
- ⁵⁰ (a) Huisgen R. *Proceedings of the Chemical Society of London*, **1961** 357. (b) Huisgen R., „Centenary Lecture – 1,3-Dipolar Cycloadditions”, London, **1960**
- ⁵¹ (a) Rostovtsev V. V., Green L. G.; Fokin V. V., Sharpless K. B. „*Angew. Chem. Int. Ed.*”, **2002**, *41*, 2596. (b) Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M., *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057.
- ⁵² Juriček M., Kouwer P. H. J., Reháč J., Sly J., Rowan A. E. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 21.
- ⁵³ Linder J., Blake A. J.; Moody, C. J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3908.
- ⁵⁴ Hansen, S. G.; Jensen, H. H. *Synlett*, **2009**, *20*, 3275.
- ⁵⁵ Kumar, R. S. C.; Reedy, G. V.; Shankaraiah, G.; Babu, K. S.; Rao, J. M. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *7*, 1114.
- ⁵⁶ Saito, Y.; Takahashi, S.; Azer, N.; Eldefrawi, A. T.; Eldefrawi, M. E.; Takahata, H. *Heterocycles* **2009**, *79* 1043.
- ⁵⁷ (a) Kiss, L.; Forró, E.; Sillanpää, R.; Fülöp, F. *Synthesis* **2010**, *1*, 153. (b) Zheng L., Byun H.-S., Bittman R., *Journal of Organic Chemistry*, **2010**, *75*, 4356-4364.
- ⁵⁸ Zhu, B-H.; Zheng, J-C.; Yu, C-B.; Sun, X-L.; Zhou, Y-G.; Shen, Q.; Tang, Y. *Org. Lett.* **2010**, *3*, 504.
- ⁵⁹ Bakunov, S. A.; Bakunova, S. M.; Wenzler, T.; Ghebru, M.; Werbovets, K. A.; Brun, R.; Tidwell, R. R. *J. Med. Chem.* **2010**, *1*, 254.
- ⁶⁰ Lee, S.; Hua, Y.; Park, H.; Flood, A. H. *Org. Lett.* **2010**, *9*, 2100.
- ⁶¹ Tao, C-Z; Cui, X.; Li, J.; Liu, A-X.; Liu, L.; Guo, Q-X. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *20*, 3525.
- ⁶² Li, C.; Henry, E.; Mani, N. K.; Tang, J.; Brochon, J-C.; Deprez, E.; Xie, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *12*, 2395.
- ⁶³ Camp, C.; Dorbes, S.; Picard, C.; Benoist, E. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *12*, 1979.
- ⁶⁴ Lőrincz K., Kele P., Novák Z., *Synthesis* **2009**, *20*, 3527-3532.
- ⁶⁵ Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseven, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.
- ⁶⁶ Hintersteiner M., Auer M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, 1130, 1-
- ⁶⁷ Imperio D., Pirali T., Galli U., Pagliai F., Cafici L. Canonico P. L., Sorba G., Genazzani A. A., Tron G. C., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 6748-6757.
- ⁶⁸ (a) Baskin J. M., Prescher J. A., Laughlin S. T., Agard N. J., Chang P. V., Miller I. A., Lo A., Codelli J. A., Bertozzi C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 16793-16797. (b) Ning X., Guo J., Wolfert M. A., Boons G.-J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2253-

-
2255. (c) Bernardin A., Guyon L., Vinet F., Texier I., Cazet A., Delannoy P. Bonnaffé D., *Bioconj. Chem.*, **2010**, *21*, 583-588.
- ⁶⁹ Chenoweth K., Chenoweth D., W. A. Goddard III, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 5255-5258.
- ⁷⁰ a) Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Madden, M. M.; Lin, Q., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2832-2835. b) Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Lin, Q., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 9654-9655.
- ⁷¹ Fahrni C. J., Yang L., VanDerveer D. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 3799-3812.
- ⁷² Gololobov, Y. G., Zhmurova, I. N., Kasukhin, L. F., *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 437-472.
- ⁷³ Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science*, **2007**, *287*, 2007-2010.
- ⁷⁴ Baccaro A., Weisbrod S. H., Marx A., *Synthesis*, **2007**, *13*, 1949-1954.
- ⁷⁵ Hantzsch, A.; Lehmann, M., *Chem. Ber.*, **1900**, *33*, 3668-3685.
- ⁷⁶ Tai, C. J.; Yang, L.; Allinger, N. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 11906-11917.
- ⁷⁷ Carboni, R. A.; Lindsey, R. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 4342-4346.
- ⁷⁸ Sauer, J.; Heinrichs, G., *Tetrahedron Lett.*, **1966**, *41*, 4979-4984.
- ⁷⁹ Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A., *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 2297-2299.
- ⁸⁰ Kele P., Li X., Link M., Nagy K., Herner A., Lőrincz K., Béni Sz., Wolfbeis O. S., *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3486-3490.
- ⁸¹ Czerney P., Wenzel M., Schweder B., Lehmann F., US20040260093, **2004**.
- ⁸² (a) Bouit, P.-A., Le Guennic, B., Aronica, C., Andraud, C., Maury, O., Di Piazza, E., Rigaut, S., Toupet, L., *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4159-4162. (b) Dyomics GmbH, EP1535969 A2, **2005** (c) Theodoropoulos, Spyros, US6617458 B2, **2003**.
- ⁸³ Wu J.-S., Liu W.-M., Zhuang X.-Q., Wang F., Wang P.-F., Tao S.-L., Zhang X.-H., Wu S.-K., Lee S.-T., *Org. Lett.* **2007**, *9*, 33-36.
- ⁸⁴ Klymchenko, A. S., Pivovarenko, V. G., Ozturk T., Demchenko, A. P., *New J. Chem.*, **2003**, *27*, 1336-1343.
- ⁸⁵ Madge D., Brannon J. H., Cremers T. L., *J. Phys. Chem.*, **1979**, *83*, 696.
- ⁸⁶ (a) Changa P. V., Preschera J. A. Sletten E. M., Baskin J. M., Miller I. A., Agard N. J., Lo A. Bertozzi C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2010**, *107*, 1821-1826. (b) Cohen A. S., Dubikovskaya E. A., Rush J. S., Bertozzi C. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 8563-8565.
- ⁸⁷ Kyvala, M., Lukes, I., Chemometrics '95, Pardubice, 1995, Book of Abstracts, p. 63; <http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>

-
- ⁸⁸ Crossley R., Goolamali Z., Gosper J. J., Sammes P. G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, Phys. Org. Chem.*, **1994**, 3, 513-520.
- ⁸⁹ Tomohiro T., Avval, P. A., Okuno H. Y., *Synthesis*, **1992**, 7, 639-640.
- ⁹⁰ Anantanarayan A., Fyles T. M., *Can. J. Chem.*, **1990**, 68, 1338-1351.
- ⁹¹ Lukyanenko N. G., Basok, S. S., Filonova L. K., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1988**, 3141-3148.
- ⁹² Maeda H., Nakatsuji Y., Okahara M., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1981**, 10, 471-472.
- ⁹³ Murillo O., Watanabe S., Nakano A., Gokel G. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7665 – 7679.
- ⁹⁴ Webb J. L., Corwin A. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1944**, 66, 1456-1459.